



Universidade de Aveiro
2011

Departamento de Química

Tiago Miguel
Marques Ereira

Bioacumulação de arsénio em *Scrobicularia
plana* na Ria de Aveiro



Universidade de Aveiro Departamento de Química
2011

**Tiago Miguel
Marques Ereira**

**Bioacumulação de arsénio em *Scrobicularia
plana* na Ria de Aveiro**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Química Analítica e Qualidade, realizada sob a orientação científica do Doutor João Pedro Martins Coelho, Investigador de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria Eduarda da Cunha Pereira, Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

O júri

Presidente

Professor Doutor Artur Manuel Soares da Silva
Professor Catedrático do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Professor Doutor Miguel Ângelo do Carmo Pardal
Professor Associado com Agregação da Faculdade de Ciências e Tecnologia
da Universidade do Coimbra

Doutor João Pedro Martins Coelho
Investigador de Pós-Doutoramento do Departamento de Química da
Universidade de Aveiro

Professora Doutora Maria Eduarda da Cunha
Professora Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Quero agradecer à Doutora Maria Eduarda Pereira pela orientação científica e em especial ao Doutor João Pedro Coelho pela partilha de conhecimentos, orientação, apoio e disponibilidade ao longo de todo o trabalho.

A todos os colegas de laboratório que contribuíram para o bom ambiente de trabalho e que estiveram sempre disponíveis para ajudar quando foi necessário.

À minha família e amigos, pelo apoio e compreensão ao longo do meu percurso académico.

Palavras-chave

Scrobicularia plana, biomonitor, arsénio, bioacumulação, Ria de Aveiro

Resumo

O principal objectivo deste trabalho foi avaliar o nível de contaminação da Ria de Aveiro por arsénio através da determinação das concentrações de arsénio nos sedimentos, matéria particulada suspensa (SPM) e água e, principalmente, avaliar a capacidade do bivalve *Scrobicularia plana* (amêijoia) como biomonitor para este contaminante na Ria de Aveiro.

Foram recolhidas amostras de sedimentos, SPM, água e amêijoia de vários locais na zona do Largo do Laranjo, com base numa análise preliminar que demonstrou existir um gradiente de contaminação por arsénio nesta zona.

As amêijoas foram divididas em cinco classes etárias com 1 cm de intervalo (C1 a C5), correspondendo a classes anuais de tamanho. A determinação do teor de arsénio total em todas as amostras foi efectuada por espectrometria de fluorescência atómica com geração de hidretos (HG-AFS).

Os teores de arsénio presente nos sedimentos, SPM e águas da Ria de Aveiro apresentaram um gradiente de concentração. Nas águas as concentrações de arsénio variaram entre 0,5 µg/L no local menos contaminado e 5,3 µg/L no local mais contaminado, enquanto nos sedimentos foram encontrados valores superiores a 90 mg/kg no local mais contaminado e na SPM, os valores atingiram os 260 mg/kg.

As concentrações de arsénio total nas amêijoas apresentam, em geral, um aumento ao longo do ciclo de vida do organismo, estando o grau de contaminação dependente dos níveis no meio envolvente, especialmente dos níveis de arsénio na SPM. A regressão linear entre as concentrações de arsénio na amêijoia e na SPM é significativa ($R^2=0,87$; $P=0,05$), indicando que esta deve ser a principal via de entrada de arsénio no organismo do bivalve.

As taxas de bioacumulação calculadas que apresentam valores mais elevados dizem respeito aos locais mais contaminados, com valores superiores a 5,5 mg/kg ano no local A1 e A3 e na ordem dos 3,5 mg/kg ano no local A2. No local de referência (A14) a taxa de bioacumulação não atingiu 1 mg/kg ano.

Os factores de bioconcentração calculados entre a amêijoia e os diferentes compartimentos ambientais demonstraram que a razão entre o teor de arsénio na amêijoia e no meio que a envolve é superior nos locais menos contaminados, concluindo-se que este bivalve não é o biomonitor ideal para monitorizar a contaminação de arsénio na Ria de Aveiro.

Keywords

Scrobicularia plana, biomonitor, arsenic, bioaccumulation, Ria de Aveiro

Abstract

The main objective of this study was to evaluate the level of arsenic contamination in the Ria de Aveiro, through the determination of arsenic in sediments, suspended particulate matter (SPM) and water, and to evaluate the possible use of *Scrobicularia plana* (clam) as a biomonitor, through the clarification of its bioaccumulation pattern.

Sediment, SPM, water and clam samples were collected from various locations in the area of the Largo do Laranjo, based on a preliminary analysis that showed an arsenic contamination gradient in the area.

The clams were divided into five age groups with 1 cm intervals (C1 to C5), corresponding to yearly size classes. The determination of total arsenic in all samples was carried out by atomic fluorescence spectrometry with hydride generation (HG-AFS).

The levels of arsenic present in sediments, SPM and water of the Ria de Aveiro presented a concentration gradient. In water, arsenic concentrations ranged from 0.5 µg/L in the less contaminated location and 5.3 µg/L in the most contaminated location. In sediments, concentrations reached as high as 90 mg/kg in the most contaminated place, while the highest arsenic concentrations were observed in SPM, reaching as high as 260 mg/kg in the same area.

The concentrations of total arsenic in clams generally increased through the life cycle of the organism and the degree of contamination depended on the environmental contamination levels, especially the levels of arsenic in SPM. The linear regression between concentrations of arsenic in clams and SPM was found to be significant ($R^2=0.87$; $P=0.05$), contrary to sediments and the dissolved phase, suggesting that this should be the main route of arsenic entry in the body of the bivalve.

Bioaccumulation rates were higher in the most contaminated sites, with values greater than 5.5 mg/kg year in sites A1 and A3 and in order of 3.5 mg/kg year on site A2. At the reference site (A14), the rate of bioaccumulation was lower than 1 mg/kg year.

The bioconcentration factors calculated between the arsenic contamination in clams and the different environmental compartments showed that the ratio between the concentration of arsenic in clams and in the surrounding medium is higher in the less contaminated sites, suggesting this bivalve not to be the ideal biomonitor to evaluate the As contamination in the Ria de Aveiro.

Índice

Índice	XI
Índice de Figuras	XIII
Índice de Tabelas	XV
1. Introdução e objetivos do trabalho	1
1.1. Introdução	3
1.2. Principais propriedades físicas e químicas do arsénio e seus compostos	5
1.3. Fontes e ocorrência do arsénio no ambiente	9
1.3.1. Fontes naturais e antropogénicas	9
1.3.2. Principais aplicações do arsénio	11
1.4. Toxicidade do arsénio	13
1.5. Ciclo do arsénio no ambiente.....	15
1.5.1. Transporte, distribuição e transformação no ambiente.....	15
1.5.2. Bioacumulação de arsénio	18
1.6. Legislação sobre níveis de arsénio no ambiente	19
1.7. O uso de bivalves como biomonitores de contaminação	21
1.8. A Ria de Aveiro	22
1.9. Objetivos	23
2. Material e métodos	25
2.1. Locais de amostragem	27
2.2. Amostragem e preparação de amostras	29
2.2.1. Amostras de água	29
2.2.2. Amostras de sedimento.....	30
2.2.3. Amostras biológicas	30

2.3.	Metodologias analíticas	31
2.3.1.	Optimização do método de digestão	31
2.3.2.	Determinação do teor de arsénio total	34
2.4.	Controlo de qualidade dos resultados	36
3.	Resultados	39
3.1.	Optimização do método de digestão	41
3.2.	Teor de arsénio total nas amostras recolhida na Ria de Aveiro	42
3.2.1.	Amostras de água - arsénio dissolvido	42
3.2.2.	Matéria particulada suspensa	43
3.2.3.	Sedimentos	44
3.2.4.	Amêijoa	45
3.2.5.	Taxa de bioacumulação anual de arsénio na amêijoa	47
3.2.6.	Factores de bioconcentração de arsénio	49
3.2.7.	Relação entre as concentrações de arsénio na amêijoa e nos diversos compartimentos ambientais	50
4.	Discussão dos resultados	53
5.	Conclusões	61
6.	Referências bibliográficas	65

Índice de Figuras

Figura 1 - Estruturas das principais espécies de arsénio que ocorrem naturalmente no ambiente (WHO, 2001).	7
Figura 2 - Esquema simplificado do ciclo do arsénio no ambiente (Adaptado de (Bhumbla and Keefer, 1994))......	15
Figura 3 - Mapa da Ria de Aveiro com a localização dos pontos da amostragem preliminar.	27
Figura 4 -Concentrações de arsénio total (mg/kg) em sedimentos de vários locais da Ria de Aveiro (amostragem preliminar).	28
Figura 5 - Esquema do sistema de fluxo contínuo de geração de hidretos (Tavares, 2010).	35
Figura 6 - Concentrações de arsénio total ($\mu\text{g/L}$) dissolvido na água. As barras de erro representam os desvios padrão.	42
Figura 7 - Concentrações de arsénio total (mg/kg) na matéria particulada suspensa. As barras de erro representam os desvios padrão.	43
Figura 8 - Concentrações de arsénio total (mg/kg) nos sedimentos. As barras de erro representam os desvios padrão.	44
Figura 9 - Concentrações de arsénio total (mg/kg, peso seco) nas amêijoas das cinco classes de tamanho nos locais de amostragem. As barras de erro representam os desvios padrão.	46

Figura 10 - Comparação das concentrações de arsénio total (mg/kg, peso seco) nas amêijoas das classes de tamanho 3, 4 e 5 e na SPM nos locais de amostragem. As barras de erro representam os desvios padrão. 47

Figura 11 – Concentração total de arsénio (mg/kg) para amêijoas pertencentes a diferentes classes de tamanho e para os diversos locais amostrados. O declive das linhas de tendência corresponde à taxa de acumulação anual de arsénio para cada local de estudo..... 48

Figura 12 - Factores de bioconcentração de arsénio para os sedimentos dos diversos locais amostrados..... 49

Figura 13 - Factores de bioconcentração de arsénio para a SPM dos diversos locais amostrados..... 49

Figura 14 - Factores de bioconcentração de arsénio para a água dos diversos locais amostrados..... 50

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Espécies de arsénio que ocorrem naturalmente no ambiente (ver estrutura dos compostos 1-22 na Figura 1) (WHO, 2001).	6
Tabela 2 - Outros compostos de arsénio presentes no ambiente (WHO, 2001).	8
Tabela 3 - Principais aplicações atuais dos compostos de arsénio.	12
Tabela 4 – Classificação, níveis e usos permitidos a sedimentos dragados segundo a lei Portuguesa (Portaria n.º 1450/2007 de 12 de Novembro)	20
Tabela 5 – Localização (coordenadas GPS) e distância dos locais de amostragem em relação à descarga de efluentes industriais.	28
Tabela 6 - Proporções de reagentes utilizados nos diferentes métodos de digestão D testados.	33
Tabela 7 – Valores obtidos e valores certificados para os materiais de referência usados na determinação das concentrações de arsénio total (valor médio \pm desvio padrão).	37
Tabela 8 – Percentagens de recuperação (%) dos vários métodos de digestão testados em diferentes materiais de referência.	41
Tabela 9 - Regressões lineares entre as concentrações de arsénio nas diversas matrizes analisadas. Os valores da tabela referem-se ao parâmetro R^2	51

1. Introdução e objetivos do trabalho

1.1. Introdução

Ao longo dos tempos, os estuários têm sido locais atrativos para a indústria e urbanização, pois proporcionam excelentes oportunidades para o transporte de mercadorias, o desenvolvimento de diversas atividades e permitem a diluição de muitos resíduos poluentes (Spencer, 2002). São também as zonas mais populosas do mundo, levando a uma pressão antropogénica adicional sobre estas zonas de grande produção biológica, berçários de um sem número de espécies de fauna (Ridgway and Shimmiel, 2002).

Os estuários, sendo zonas importantes de transferência de sedimentos entre sistemas fluviais e marítimos, estão sujeitos à descarga de uma elevada quantidade de partículas às quais se associam contaminantes, provenientes de atividades agrícolas, industriais e de lazer (Ridgway and Shimmiel, 2002). Devido a processos de sedimentação e ressuspensão constantes, a fracção sedimentar assume um papel essencial no ciclo biogeoquímico de muitos contaminantes, servindo como fonte, reservatório ou mediando a sua transformação (Moreira et al., 2006).

A distribuição e disponibilidade dos contaminantes nos sedimentos tem importância em todo o sistema estuarino, uma vez que nele habitam plantas e animais que têm papel importante na cadeia alimentar. A bioacumulação desses contaminantes por estes organismos pode resultar na passagem desses elementos para peixes, aves, mamíferos e para o Homem, trazendo problemas à sua saúde (Ridgway and Shimmiel, 2002).

Muitos dos contaminantes que afectam o ambiente marinho são metais e metalóides que se destacam negativamente (Agusa et al., 2008) pelas suas características tóxicas. Metais como o cobre e o zinco são considerados essenciais na manutenção do metabolismo dos organismos, mas podem ser tóxicos em concentrações elevadas (Miguel et al., 1999, Rodrigues et al., 2010). Outros como o mercúrio e o arsénio não têm qualquer função metabólica e apresentam elevada toxicidade, mesmo quando presentes em baixas concentrações. As principais fontes naturais destes elementos potencialmente tóxicos no ambiente aquático são a atividade vulcânica e a erosão de rochas; contudo a contaminação por estes elementos está quase sempre ligada a atividades humanas, principalmente as atividades agrícolas, industriais e domésticas (Viarengo and Canesi, 1991).

Os perigos associados à presença deste tipo de compostos no ambiente derivam não só da sua persistência e toxicidade, mas também da capacidade de concentração ao longo da cadeia trófica, colocando em perigo a nossa saúde (Miguel et al., 1999). Este problema despertou grande interesse por parte da comunidade científica, no conhecimento dos percursos e destinos dos contaminantes nos ecossistemas costeiros e estuarinos de todas as regiões do mundo (Joiris and Azokwu, 1999), no sentido de avaliar o estado atual de contaminação dos sistemas estuarinos e na procura de medidas de proteção para estes ecossistemas. Inicialmente, esta avaliação baseava-se nas componentes abióticas (fracção dissolvida e sedimentar), mas nem sempre esta análise reflete a disponibilidade dos contaminantes para os organismos, sendo esta dependente de inúmeros factores físico-químicos, tanto na coluna de água como no sedimento (Coelho et al., 2009).

Face a algumas limitações da monitorização da componente abiótica, essencialmente a dificuldade de refletir a biodisponibilidade de contaminantes para as comunidades biológicas, foi proposto o uso de organismos vivos para avaliar a disponibilidade destes contaminantes para a cadeia trófica, uma vez que estes acumulam ao longo do tempo a porção de contaminantes disponíveis na coluna de água ou nos sedimentos em seu redor. Esta monitorização permite prever a forma como os organismos vivos são afectados ao longo da cadeia trófica e, conseqüentemente, como poderá afectar os seres humanos (Joiris and Azokwu, 1999). A biomonitorização é, hoje em dia, uma metodologia muito utilizada e foi recentemente enfatizada a nível europeu no enquadramento da Diretiva Quadro da Água, que regulamenta medidas, não apenas para a melhoria química das massas de água, mas também para a melhoria do *status* ecológico das mesmas, numa abordagem multidisciplinar (Coelho et al., 2009).

A procura de espécies que reflitam o nível de contaminação ambiental tem sido uma área de investigação prioritária e, enquanto para alguns contaminantes como o mercúrio existe já informação considerável, para outros como o arsénio o conhecimento disponível é ainda insuficiente e muito fragmentado. Assim sendo, e tendo em conta a elevada toxicidade de algumas formas de arsénio, torna-se urgente aprofundar os conhecimentos sobre os processos de bioacumulação deste contaminante em espécies de ecossistemas estuarinos.

1.2.Principais propriedades físicas e químicas do arsénio e seus compostos

O arsénio (As) é um semi-metal que pertence ao grupo 15 da tabela periódica, assim como o azoto (N), o fósforo (P), o antimónio (Sb) e o bismuto (Bi). Tem número atómico 33, massa atómica 74,922 g/mol e uma densidade de 5,73 g/cm³ e pode encontrar-se em quatro estados de oxidação, sendo eles -3, 0, +3 e +5. As formas elementares (0) e arsina (AsH₃) (-3) existem apenas em ambientes fortemente redutores. Em condições moderadamente redutoras a forma mais comum é o arsenito (+3), mas em ambiente oxigenado, a forma mais estável é o arsenato (+5).

O arsénio e os seus compostos ocorrem geralmente em pequenas quantidades em rochas, solos, água e ar sob formas amorfas, cristalinas, vítreas ou em pó. Contudo, como resultado de atividades antropogénicas, como a mineração, fundição de metais, combustão de combustíveis fósseis e a utilização de pesticidas, o arsénio pode ocorrer em maiores concentrações em determinadas áreas. Existem muitos compostos de arsénio com importância ambiental (WHO, 2001).

Na Tabela 1 estão identificados os compostos de arsénio mais abundantes no sistema aquático, podendo ser alguns deles encontrados também em sistemas terrestres. Na Figura 1 estão representadas as suas estruturas moleculares e na Tabela 2 estão identificados outros compostos de arsénio existentes na natureza.

Tabela 1 - Espécies de arsénio que ocorrem naturalmente no ambiente (ver estrutura dos compostos 1-22 na Figura 1) (WHO, 2001).

Nr. CAS	Nome	Sinónimo	Estrutura
	arsenato		[1]
	arsenito		[2]
124-58-3	ácido metilarsónico	ácido monometilarsónico, MMA	[3]
75-60-5	ácido dimetilarsínico	ácido cacodílico, DMA	[4]
4964-14-1	óxido trimetilarsino		[5]
27742-38-7	ião tetrametilarsónio		[6]
64436-13-1	arsenobetaina		[7]
39895-81-3	arsenocolina		[8]
	dimetilarsinoilribósidos		[9-19]
	trialquilarsónioribósidos		[20,21]
	sulfato de dimetilarsinoilribitol		[22]

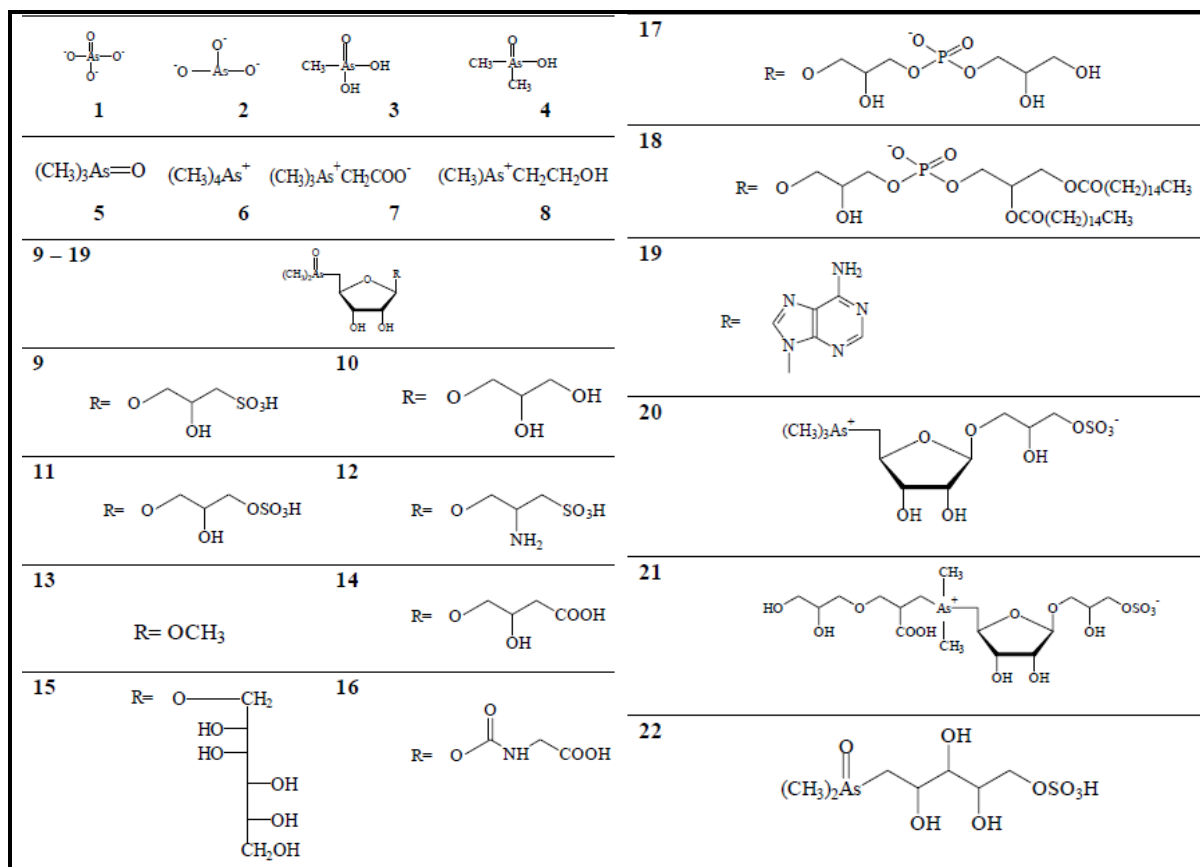


Figura 1 - Estruturas das principais espécies de arsénio que ocorrem naturalmente no ambiente (WHO, 2001).

Tabela 2 - Outros compostos de arsénio presentes no ambiente (WHO, 2001).

Nr. CAS	Nome	Sinónimo	Estrutura
Arsénio inorgânico trivalente			
1327-53-3	óxido de arsénio (III)	trióxido de arsénio, óxido arsenoso, arsénio branco	As_2O_3 ou As_4O_6
13768-07-5	ácido arsenenoso	ácido arsenioso	HAsO_2
7784-34-1	cloreto de arsénio (III)	tricloreto de arsénio, tricloreto arsenoso	AsCl_3
1303-33-9	sulfureto de arsénio (III)		As_2S_3
Arsénio inorgânico pentavalente			
1303-28-2	óxido de arsénio (V)	pentóxido de arsénio	As_2O_5
7778-39-4	ácido arsénico	ácido orto-arsénico	H_3AsO_4
10102-53-1	ácido arsenénico arsenatos, sais de ácido orto-arsénico	ácido meta-arsénico	HAsO_3
			H_2AsO_4^- , HAsO_4^{2-} , AsO_4^{3-}
Arsénio orgânico			
593-52-2	metilarsina		CH_3AsH_2
593-57-7	dimetilarsina		$(\text{CH}_3)_2\text{AsH}$
593-88-4	trimetilarsina		$(\text{CH}_3)_3\text{As}$
	dialquilcloroarsina		R_2AsCl
	alquilcloroarsina		RAsCl_2

1.3. Fontes e ocorrência do arsénio no ambiente

1.3.1. Fontes naturais e antropogénicas

As principais fontes naturais de arsénio são as rochas dos quais ele deriva (Yan-Chu, 1994). O arsénio faz parte da constituição de mais de 200 espécies minerais, sendo que em cerca de 60% aparece sob a forma de arsenatos, 20% de sulfuretos e sais de enxofre e os restantes 20% na forma de arsenietos, arsenitos, óxidos e arsénio elementar (Nriagu, 1994). O mineral de arsénio mais comum é a arsenopirite (FeAsS). A tendência que o arsénio tem para se ligar a ligandos contendo enxofre, faz com que este seja regularmente encontrado em depósitos de minerais de sulfuretos, como mineral isolado ou como constituinte de outros minerais (Boyle and Jonasson, 1973). Isto leva a que alguns solos, próximos de zonas de mineração, apresentem, por vezes, concentrações de arsénio elevadas, variando desde algumas miligramas até mais de 100 mg/kg. As concentrações em vários tipos de rochas ígneas variam entre menos de 1 a 15 mg/kg, com um valor médio de aproximadamente 2 mg/kg. As concentrações em arenitos e calcários rondam os 10-20 mg/kg, enquanto em rochas sedimentares argilosas, como argilas e xistos, as concentrações podem atingir 900 mg/kg. Em rochas fosfáticas as concentrações não ultrapassam os 200 mg/kg (O'Neill, 1990).

A atividade vulcânica é considerada a segunda maior fonte natural de arsénio. Os gases libertados devido a volatilização e os compostos de arsénio facilmente voláteis presentes nos solos contribuem significativamente para o fluxo de arsénio para a atmosfera. Estas fontes naturais são responsáveis por 60% do fluxo global de arsénio, cerca de 73.540 toneladas por ano que circulam na atmosfera. Os restantes 40% derivam de fontes antropogénicas (WHO, 2001).

O arsénio tem sido libertado para o ambiente pela indústria, operações de mineração, agricultura e silvicultura. Em 1988, a maior componente provinha de produtos comerciais, com 60%, seguindo-se as cinzas de carvão com 25% (Yan-Chu, 1994). Os principais processos industriais responsáveis pela contaminação dos solos, água e ar por arsénio, são a fundição de metais não ferrosos e a produção de energia a partir de combustíveis fósseis, seguindo-se o fabrico de pesticidas à base de arsénio e os processos de conservação de madeiras. Das fontes indicadas, a fundição de metais é aquela que mais polui a atmosfera (Chilvers and Peterson, 1987).

Os resíduos da mineração de metais são uma fonte significativa de espécies de arsénio que podem levar à contaminação dos solos adjacentes ao local da mina e, por lixiviação, podem também contaminar as águas subterrâneas. Só nos Estados Unidos, estima-se que existam vários biliões de toneladas destes resíduos. Estes resíduos contêm enxofre que, ao entrar em contacto com a humidade atmosférica formam ácidos que depois podem lixiviar vários compostos, incluindo os de arsénio (WHO, 2001).

A organização holandesa para pesquisa científica aplicada (TNO) efectuou um inventário de emissões de metais de 38 países europeus. Segundo este inventário, as emissões totais de arsénio são de 575 toneladas/ano, provenientes de duas fontes principais: fontes fixas de combustão de carvão e óleos combustíveis (494 toneladas/ano) e processos de produção (77,3 toneladas/ano). Na categoria da combustão, a produção de eletricidade e o aquecimento urbano equivalem a 56,3% das emissões de arsénio. Nos processos de produção, 45,4% das emissões são atribuídas à indústria do ferro e do aço (European Commission, 2000). O grupo de trabalho da União Europeia (European Commission DG Environment/direção com responsabilidades para o ambiente) concluiu que houve grandes reduções nas emissões de arsénio para a atmosfera em diversos países membros da União Europeia na década de 80 e inícios da década de 90 (European Commission, 2000).

Relativamente à atividade agrícola, a partir da década de 60 houve uma mudança no uso de herbicidas. Os compostos inorgânicos como o chumbo, cálcio, acetoarsenito, e arsenato de cobre, foram substituídos por compostos orgânicos e inorgânicos como o ácido arsénico, arsenato de sódio, MMA e DMA (Woolson, 1983). Na Austrália, na primeira metade do século XX, o trióxido de arsénio (As_2O_3) foi amplamente usado para controlar a piropilose bovina, tendo como consequência uma contaminação geral por arsénio. Em 1983, os pesticidas e herbicidas à base de arsénio eram dos mais usados para controlo biológico nos EUA, num total estimado de 7 a 11 mil toneladas por ano. Nos pomares eram usados entre 32 a 700 kg de arsénio por hectare, chegando-se a registar, nos solos, valores de 2500 mg/kg (Woolson, 1983).

As lamas dos esgotos urbanos podem conter quantidades significativas de arsénio provenientes do escoamento de águas residuais de várias fontes, como os resíduos do uso de pesticidas e detergentes fosfatados, de efluentes industriais e mesmo do arsénio presente na atmosfera que é depositado quando ocorre precipitação. Os níveis de arsénio nas lamas

dos esgotos são um indicador do grau de industrialização da área servida por esse sistema de esgotos. Como exemplo, em Inglaterra foram registados valores de arsénio de 0-188 mg/kg em lamas secas (Woolson, 1983). Estima-se que neste país sejam utilizadas cerca de 2,5 toneladas de arsénio em terrenos agrícolas por ano, provenientes de lamas de esgotos e 6,1 toneladas por ano resultantes da utilização de fertilizantes (O'Neill, 1990). Em Iowa, nos EUA, foram também reportados valores de 2,4-39,6 mg/kg com média de 9,8 mg/kg em lamas de depuração das estações de tratamento de resíduos (Zhu and Tabatabai, 1995).

1.3.2. Principais aplicações do arsénio

O conhecimento dos primeiros usos intencionais do arsénio é um tema algo controverso, pois acredita-se que na antiguidade este metalóide não era conhecido, pelo menos como elemento isolado. No entanto, há registos de ferramentas e peças ornamentais construídas com ligas de cobre e arsénio, datadas em 4 milénios A.C. Há também registos de algumas pinturas feitas com tintas em que alguns ingredientes eram à base de arsénio. No terceiro milénio antes de Cristo, o arsénio foi também utilizado para criar o efeito de superfície prateada em espelhos e estatuetas e como fundente na produção de vidro. Mais tarde, as suas principais aplicações foram na área farmacêutica e na medicina, embora em 1600 já se conhecessem os seus efeitos tóxicos e este fosse recomendado contra pragas de insectos em arrozais (Azcue and Nriagu, 1994). Sabendo isto, muitos homicidas usavam arsénio (As_2O_3) como veneno, contrastando com usos mais dignos dados por alguns médicos, usando compostos de arsénio como antibióticos no tratamento de reumatismo, artrites, malária, tuberculose, diabetes e mais tarde a sífilis (Azcue and Nriagu, 1994).

Por volta de 1880, a Comissão da Sociedade Médica de Londres, preocupada com o vasto uso de compostos de arsénio, emitiu uma série de artigos que alertavam para o perigo que representavam alguns materiais que tinham na sua constituição compostos de arsénio. Esta comissão concluiu também que algumas utilizações dadas ao arsénio eram desnecessárias e deviam ser proibidas. Esta conclusão tem relevante importância histórica, pois foi a primeira vez que foi sugerido haver um controlo na utilização de compostos que são prejudiciais ao ambiente, aplicando níveis máximos permitidos (Azcue and Nriagu, 1994).

Ao longo dos anos, o Homem encontrou novos benefícios das propriedades do arsénio e dos seus compostos e o seu uso cresceu exponencialmente nos últimos 150 anos. Na Tabela 3 estão indicados as principais aplicações dos compostos de arsénio na atualidade.

Tabela 3 - Principais aplicações atuais dos compostos de arsénio.

Sector	Aplicações
Agricultura	Pesticidas, insecticidas, desfolhantes, conservadores de madeira, descasque de árvores, esterilização de solos
Produção	
Animal	Aditivos alimentares, prevenção de doenças, algicidas
Medicina	Antibiótico anti-sifílico, tratamento de tripanossomíase, amebíase, doença do sono
Electrónica	Células solares, dispositivos optoelectrónicos, aplicações de semicondutores, díodos emissores de luz
Indústria	Artigos de vidro, electrofotografia, catalisadores, pirotecnia, tintas antiferrugem, cerâmica, substâncias farmacêuticas
Metalúrgica	Ligas (soldas de carroçarias e radiadores), placas de baterias (endurecedores)

Desde a década de 1860 até à introdução do DDT e de outros pesticidas orgânicos em 1940, os compostos inorgânicos de arsénio eram a forma dominante de insecticidas à disposição dos agricultores e fruticultores o que levou à contaminação em massa dos solos de cultura. A preocupação com os resíduos de arsenato de chumbo em produtos agrícolas teve um papel importante no despertar da consciência pública nos EUA sobre a segurança alimentar e contaminação ambiental da comida (Azcue and Nriagu, 1994).

Hoje em dia, cerca de 75% da utilização de arsénio ainda é feita no sector agrícola, na forma de metilarsonato monossódico (MSMA), metilarsonato dissódico (DSMA), ácido dimetilarsínico e ácido arsénico. O ácido arsénico, apesar de alguma discórdia, ainda é usado na formação de sais conservantes de madeira e soluções de arsenito de sódio são ainda usadas para descascar árvores e no controlo de plantas aquáticas. O ácido arsenílico é usado como aditivo nas rações de aves e suínos (Azcue and Nriagu, 1994).

O arsénio metálico é usado principalmente no fabrico de ligas metálicas combinando-se com chumbo e com cobre. Arsénio metálico de alta pureza (99,999%) é usado na indústria electrónica, principalmente sob a forma de arsenieto de gálio ou índio, formando semicondutores. O arsenieto de gálio é um semicondutor melhor que os componentes de silício usados convencionalmente, mas também mais caro e é usado no fabrico de díodos emissores de luz (LED's), células solares e emissores de infravermelho. O arsenieto de índio tem sido usado para produzir o efeito de Hall, em dispositivos de infravermelho e em lasers experimentais (Azcue and Nriagu, 1994).

1.4. Toxicidade do arsénio

O arsénio é há muito conhecido devido à sua toxicidade aguda e crónica., esta última devido ao seu uso medicinal. Ao longo dos anos tem produzido efeitos graves em diferentes sistemas/órgãos de seres humanos após exposição oral ou por inalação (WHO, 2001).

As espécies inorgânicas de arsénio são mais tóxicas que as orgânicas para os organismos. O arsénio (III) é considerado aproximadamente 60 vezes mais tóxico que o arsénio (V), sendo qualquer destas formas cerca de 100 vezes mais tóxicas que as formas orgânicas (MMA e DMA). A toxicidade destes compostos varia na ordem decrescente: As (III) (arsenito) > As (V) (arsenato) > MMA (V) (monometilarsenato) > DMA (V) (dimetilarsenato) (Jain and Ali, 2000).

O arsénio inorgânico solúvel é altamente tóxico e a ingestão de grandes quantidades leva a problemas gastrointestinais, distúrbios nas funções do sistema cardiovascular e nervoso e até à morte. A exposição prolongada a arsénio dissolvido em água está relacionada com o aumento do risco de contrair cancro de pele, pulmões, bexiga e rim, bem como alterações na pele, tais como hiperqueratose e alterações de pigmentação. A exposição ocupacional ao arsénio ocorre principalmente por inalação e é normalmente associada ao cancro do pulmão. Existem ainda outros sintomas como hipertensão, diabetes, efeitos na reprodução, doenças neurovasculares e outros efeitos neurológicos a longo prazo. Apesar disto, alguns compostos de arsénio ainda hoje são usados na medicina (WHO, 2001).

1.5. Ciclo do arsénio no ambiente

1.5.1. Transporte, distribuição e transformação no ambiente

Os compostos de arsénio sofrem constantes transformações, alternando entre o estado sólido, aquoso e gasoso, podendo haver trocas destas espécies entre os solos, águas, ar e seres vivos (Bhumbla and Keefer, 1994). Na Figura 2 está representado um esquema simplificado do ciclo do arsénio no ambiente.

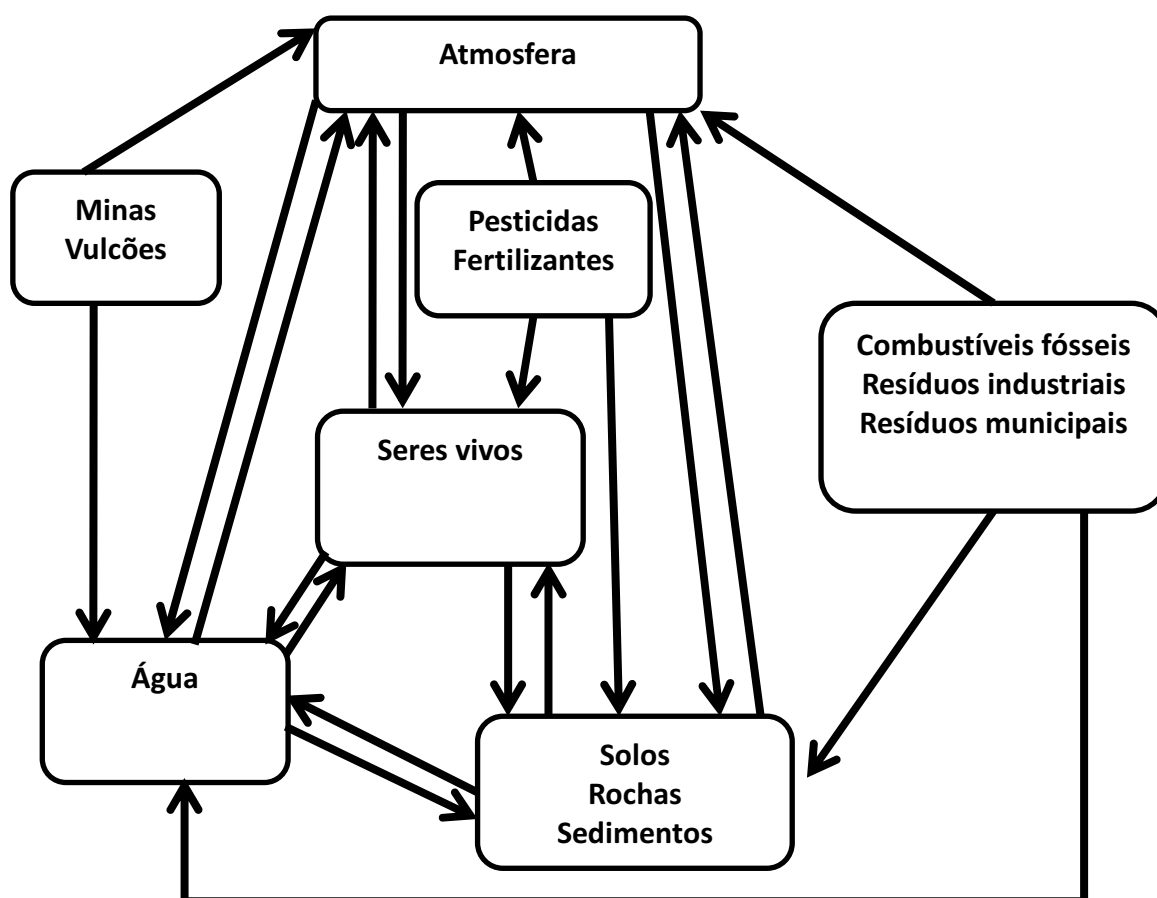


Figura 2 - Esquema simplificado do ciclo do arsénio no ambiente (Adaptado de (Bhumbla and Keefer, 1994)).

O arsénio é emitido para a atmosfera principalmente por processos envolvendo altas temperaturas, como a produção de energia através de carvão, fusão de metais, queimadas e atividade vulcânica. Alguns processos de metilação e redução microbial que ocorrem a baixas temperaturas e em meios aeróbios ou anaeróbios também contribuem para a libertação de arsénio para a atmosfera, uma vez que são libertados derivados

metilados de arsénio voláteis (Tamaki and Frankenberger, 1992). A principal forma emitida é o óxido de arsénio (As_2O_3) e com menor frequência algumas formas orgânicas voláteis, existindo sobretudo sob a forma de partículas em suspensão. Estas partículas são dispersas pelo vento e são devolvidas à Terra por deposição húmida ou seca (Coles et al., 1979).

O total de emissões atmosféricas de arsénio, incluindo fontes antropogénicas e fontes naturais, tem sido estimado em 31.000 toneladas/ano e a sua remoção de cerca de 30 a 50.000 toneladas/ano, levando a um tempo de residência na atmosfera de cerca de 9 dias (Walsh et al., 1979). Do arsénio total, estima-se que, por ano, 24.000 toneladas sejam depositadas nos solos e 9.000 toneladas nos oceanos (Akeredolu et al., 1994).

O arsénio presente em rochas e solos pode ser transportado pelo vento ou erosão hídrica. No entanto, alguns compostos, mesmo sendo lixiviados pela água da chuva ou pela neve derretida, têm tendência a ser adsorvidos pelos solos e não sofrem grandes deslocamentos (Moore et al., 1988). Em condições redutoras a forma predominante nos solos é o arsenito, podendo também existir arsina e arsénio elementar. Em solos bem drenados, o arsénio ocorre na forma H_2AsO_4^- se o solo for ácido ou sob forma HAsO_4^{2-} se o solo for alcalino (WHO, 2001). Em águas intersticiais de solos aeróbios o arsenato é a forma predominante, ocorrendo também pequenas quantidades de arsenito e MMA em zonas mineralizadas. Estes compostos sofrem naturalmente reações de oxidação, redução, adsorção, dissolução e volatilização (Bhumbla and Keefer, 1994).

As principais vias de entrada do arsénio em ambiente marinho e estuarino são o escoamento de rios e a deposição atmosférica. O arsénio é recebido sobre a forma de arsenito e arsenato, mas, devido à absorção biológica, há uma alteração na especiação do composto, havendo um aumento de espécies de arsénio reduzidas e metiladas. Ocorre também redução do arsenato a arsenito por microorganismos, oxidação de arsenito a arsenato e diluição das espécies devido ao contacto com o mar nestas zonas (Sanders, 1980).

O potencial redox, o pH e os processos biológicos influenciam a interconversão entre espécies com diferentes estados de oxidação (As(III) e As(V)). Algumas espécies têm afinidade por superfícies argilosas e matéria orgânica e isso pode afectar o seu

comportamento ambiental. Além dessa afinidade, reações de metilação e desmetilação também influenciam a mobilização e conseqüentemente a distribuição dos compostos de arsénio (Mok and Wai, 1994). Na maioria das condições de redução (meio ácido ou ligeiramente alcalino) o arsenito predomina (Nriagu, 1994).

O transporte e especiação do arsénio dependem da forma química em que se encontra e da interação com outros compostos, uma vez que este pode ser adsorvido por argilas, óxidos hidratados de ferro, hidróxidos de alumínio, compostos de manganésio e material orgânico. Nos sedimentos este processo depende da qualidade da água, das comunidades biológicas locais e do próprio tipo de sedimento (WHO, 2001). A presença de arsénio nas águas intersticiais dos sedimentos é controlada pela solubilidade de óxidos de ferro e manganésio hidratados em zonas oxidadas e de sulfuretos metálicos em zonas redutoras. Em ambiente redutor os óxidos de ferro e manganésio hidratados dissolvem-se e o arsénio é libertado para as águas subterrâneas principalmente sob a forma de arsenito (Moore et al., 1988). A mobilização do arsénio é mais provável de ocorrer em sedimentos com baixo teor em óxidos de ferro e manganésio hidratados e em carbonato de cálcio (WHO, 2001).

Segundo um estudo realizado por Riedel (1993) sobre a distribuição das espécies sólidas e dissolvidas de arsénio em sedimentos de estuários contaminados, o arsenito é a forma dissolvida e sólida predominante nos sedimentos profundos, com ambiente redutor, enquanto o arsenato é a forma dominante na camada superficial, mais oxidada. Na água intersticial, mantém-se este gradiente, havendo uma passagem, por oxidação, de arsenito a arsenato à medida que a profundidade diminui.

Apesar da ressuspensão física poder produzir um grande fluxo do arsénio a partir dos sedimentos, é a atividade biológica contínua o factor de maior relevância na mobilização de arsénio nos sedimentos (Riedel et al., 1987). Foram feitos alguns balanços da movimentação das espécies de arsénio nestes ambientes e o ciclo do arsénio no fitoplancton corresponde à maior parcela. O arsénio inorgânico é absorvido pelo fitoplancton e reciclado quando este é consumido e degradado (Millward et al., 1997).

1.5.2. Bioacumulação de arsénio

A bioacumulação envolve dois processos distintos: o primeiro, conhecido por bioconcentração, é a absorção do contaminante das águas para os organismos, que ocorre desde os níveis tróficos mais baixos até aos níveis superiores da cadeia trófica; o segundo processo é conhecido por bioampliação e ocorre porque a fonte de alimentação dos níveis tróficos superiores é progressivamente mais contaminada e desta forma amplifica as taxas de acumulação no topo da cadeia (Watras et al., 1998).

Em organismos aquáticos ocorre bioacumulação de compostos orgânicos de arsénio, após a sua biogénese a partir de compostos inorgânicos. Os fatores de bioconcentração de compostos orgânicos de arsénio em organismos marinhos são mais elevados do que para invertebrados e peixes de água doce. Além de bioconcentração, há também estudos que provam existir bioampliação nas cadeias tróficas aquáticas (Agusa et al., 2008, Barwick and Maher, 2003, Culioli et al., 2009, Francesconi et al., 1999).

Os níveis de arsénio são geralmente superiores em organismos que habitam zonas próximas de fontes antropogénicas ou em áreas com atividade geotérmica, podendo nalgumas espécies próximas de minas de arsénio atingir 3000 mg/kg (WHO, 2001).

O fitoplâncton consegue assimilar facilmente o arsenato e incorporar pequenas porções nas suas células. A maioria do arsenato incorporado é reduzida, metilada e devolvida ao meio envolvente em formas orgânicas, menos tóxicas (Sanders, 1980). Os invertebrados aquáticos que se alimentam de fitoplâncton contaminado com arsénio apresentam um aumento da quantidade corporal de arsénio, e pensa-se que o contributo do alimento para os níveis de arsénio nestes organismos é maior que o das águas (Sanders, 1980). Num estudo de laboratório, Suhendrayatna et al (2002) concluíram que a acumulação direta de arsénio por uma espécie de peixe (*Tilapia mossambica*) é proporcional à concentração de arsénio na água.

Francesconi et al.(1999) expuseram mexilhões (*Mytilus edulis*) a diferentes espécies de arsénio e concluíram que todas elas eram acumuladas, sendo que a arsenobetaína foi absorvida com maior eficiência. Concluíram também que todos os compostos foram absorvidos sem sofrer qualquer alteração e mesmo após um período de depuração de 46 dias, não houve reduções significativas nas concentrações de arsénio nos bivalves. Um outro estudo mostra que independentemente da origem e dos meios de transporte, o arsénio é bioacumulado activamente pelos bivalves (Valette-Silver et al., 1999).

Unlu and Fowler (1979) concluíram que os moluscos acumulam significativamente mais arsénio a 21°C do que a 12°C e que a absorção de arsénio é inversamente proporcional à salinidade. Constataram ainda que a eliminação de arsénio é feita de forma bifásica, com tempos biológicos de meia vida de 3 e 32 dias para os processos rápido e lento, respectivamente e contribui para a eliminação total de arsénio dos organismos.

Tendo em conta que o grande reservatório de arsénio em ambientes estuarinos é a fase sedimentar, organismos bentónicos que estejam em contacto direto e permanente com esta fonte de contaminação estarão em maior risco de acumular níveis elevados de arsénio. Como muitas espécies estuarinas, nomeadamente bivalves, são consumidas diretamente pelas populações, estas podem constituir um risco de saúde humana que será essencial avaliar (de Mora et al., 2004).

1.6. Legislação sobre níveis de arsénio no ambiente

Em Portugal, a legislação existente relativa ao arsénio em águas consiste em limites máximos permitidos para águas de consumo humano e em efluentes industriais. O Instituto Regulador de Águas e Resíduos (IRAR), ao abrigo do Decreto-Lei nº 306/2007, de 27 de Agosto, estabelece o limite máximo de arsénio em águas de consumo em 10 µg/L, enquanto para águas residuais o valor limite de emissão na descarga destas águas, ao abrigo do Decreto-Lei nº 236/1998, de 1 de Agosto, é de 1000 µg/L de arsénio.

Relativamente aos sedimentos, existe apenas uma portaria que limita a utilização de materiais dragados dependendo dos níveis de contaminação (Portaria n.º 1450/2007 de 12 de Novembro), que estabelece 5 classes de contaminação e determina os usos possíveis para cada classe (Tabela 4).

Tabela 4 – Classificação, níveis e usos permitidos a sedimentos dragados segundo a lei Portuguesa (Portaria n.º 1450/2007 de 12 de Novembro)

Classificação	Concentração de arsénio (mg/kg)	Destino do material dragado
Classe 1	< 20	Material dragado limpo — pode ser depositado no meio aquático ou repostado em locais sujeitos a erosão ou utilizado para alimentação de praias sem normas restritivas.
Classe 2	20 – 50	Material dragado com contaminação vestigial — pode ser imerso no meio aquático tendo em atenção as características do meio receptor e o uso legítimo do mesmo.
Classe 3	50 – 100	Material dragado ligeiramente contaminado — pode ser utilizado para terraplenos ou no caso de imersão necessita de estudo aprofundado do local de deposição e monitorização posterior do mesmo.
Classe 4	100 – 500	Material dragado contaminado — preposição em terra, em local impermeabilizado, com a recomendação de posterior cobertura de solos impermeáveis.
Classe 5	> 500	Material muito contaminado — idealmente não deverá ser dragado e em caso imperativo, deverão os dragados ser encaminhados para tratamento prévio e ou deposição em aterro de resíduos devidamente autorizado, sendo proibida a sua imersão.

Relativamente à legislação para os organismos, existe uma portaria que limita os níveis de arsénio em comida animal (Decreto -Lei n.º 193/2007, de 14 de Maio), variando este limite entre 2 e 40 mg/kg, dependendo do produto em questão. Legislação sobre arsénio em alimentos de consumo humano não existe de momento, sendo que decorrem discussões a nível da União Europeia para determinar níveis máximos de arsénio em alimentos, estando esta legislação essencialmente dependente da evolução das metodologias de determinação de arsénio.

Torna-se por isso essencial aprofundar o estudo da dinâmica deste contaminante no ambiente e dos processos de bioacumulação dos diversos compostos de arsénio, por forma a avaliar o risco associado ao consumo de espécies contaminadas. Esta informação poderá depois ser usada com o objectivo último de chegar a um consenso relativamente a legislar os níveis máximos de arsénio em produtos para consumo humano, atualmente em falta a nível europeu.

1.7.0 uso de bivalves como biomonitores de contaminação

O uso de biomonitores é uma forma eficaz de obter informação sobre a biodisponibilidade de contaminantes no ambiente. Por vezes, os termos biomonitor e bioindicador são confundidos e usados de forma incorreta, mas existe uma forma simples de diferenciar ambos os conceitos. Enquanto o biomonitor é capaz de fornecer dados quantitativos sobre os níveis de contaminação ambiental, os bioindicadores apenas fornecem dados qualitativos, pela presença ou ausência em caso de contaminação.

Um bom biomonitor deve possuir algumas características, entre as quais ser sésil, abundante e fácil de identificar e amostrar. É também importante que sejam resistentes e tolerantes ao *stress* e às variações ambientais, não apresentando qualquer tipo de regulação no processo de bioacumulação, acumulando os contaminantes proporcionalmente à sua concentração no meio. Contudo, uma vez que existem várias vias pelas quais os organismos podem estar expostos à contaminação e a reação à exposição a diferentes contaminantes varia de espécie para espécie, nem todos os biomonitores são adequados a um caso específico.

Os moluscos bivalves são, por norma, bons acumuladores de elementos potencialmente tóxicos e têm características fisiológicas que os tornam bons organismos biomonitores (Byrne and O'Halloran, 2001). Foram já realizados diversos estudos sobre uso de bivalves como biomonitores de metais e metalóides em vários locais do mundo, como na Irlanda (Byrne and O'Halloran, 1999, Byrne and O'Halloran, 2001, Ridgway et al., 2003), Espanha (Ruiz and Saiz-Salinas, 2000) e em Portugal, na ria de Aveiro (Rosa, 2006, Coelho, 2009), contudo não são conhecidos estudos relativamente à acumulação de arsénio neste organismo.

O bivalve *Scrobicularia plana* é um molusco bivalve de vida longa que habita nos sedimentos superficiais (primeiros 40 cm) dos ecossistemas estuarinos (Verdelhos, 2003) e distribui-se desde a Noruega até ao Senegal (Byrne and O'Halloran, 1999). A sua alimentação é feita através de um sifão que sonda continuamente a superfície dos sedimentos, filtrando os detritos depositados na interface, ingerindo desta forma a matéria particulada recentemente depositada (Byrne and O'Halloran, 1999, Essink et al., 1991). Este organismo é resistente a grandes variações de salinidade (entre 4 e 30‰) e reproduz-se uma vez por ano, sendo que numa fase inicial, plantónica, se desloca ao sabor das

correntes (Essink et al., 1991). À medida que vai crescendo, torna-se mais pesado e deposita-se na superfície dos sedimentos por ação da gravidade, processo denominado de recrutamento bentónico (Essink et al., 1991). Tendo em conta o vasto conhecimento sobre o ciclo de vida e a biologia desta espécie, torna-se possível avaliar os processos de bioacumulação de contaminantes ao longo do seu ciclo de vida, algo que já foi feito para o mercúrio (Coelho et al., 2006). Por outro lado, uma vez que esta espécie é um recurso estuarino explorado por populações locais, é importante avaliar os processos de bioacumulação de contaminantes numa vertente de saúde alimentar, avaliando a evolução dos níveis de contaminantes nas classes de tamanho passíveis de comercialização, tendo em consideração que o tamanho mínimo legal para captura de amêijoas é de 25 mm de acordo com o estabelecido na Portaria nº 27/2001 de 15 de Janeiro de 2001, alterada a 1 de Outubro de 2004 pela portaria nº 1266/2004 do Ministério da Agricultura, Pescas e Florestas e rectificado pela Declaração de rectificação nº 99/2004, publicada no Diário da República nº 264 de 10 de Novembro de 2004.

1.8. A Ria de Aveiro

A Ria de Aveiro situa-se no Oceano Atlântico, na costa norte de Portugal, estendendo-se ao longo de 45 km num eixo norte-sul e com largura máxima (num eixo perpendicular ao referido anteriormente) de 10 km entre o Bico do Muranzel e o Largo do Laranjo (Rosa, 2006).

Apresenta uma morfologia complexa, sendo constituída por vários canais ramificados e está ligada ao oceano Atlântico apenas por uma saída. A sua área é de cerca de 83 km² em preia-mar e de 66 km² em baixa-mar, com profundidades entre 0 e 20 m (nos canais de navegação), embora predominem zonas pouco profundas (inferiores a 1 m) que ficam a descoberto em baixa-mar. As marés são na sua grande maioria semidiurnas, com uma amplitude média de 2 m, sendo que a variação mínima ronda os 0,6 m em maré morta e a máxima ronda os 3,2 m, levando a níveis de água máximos de 3,5 m e mínimos de 0,3 m (Coelho, 2009).

O grande foco de estudo na Ria de Aveiro tem sido o mercúrio, tendo em conta a contaminação histórica do sistema devido às descargas de efluentes de uma indústria de produção de soda cáustica, cujo ponto de entrada na Ria era o Largo do Laranjo. Não

existem, ao invés, estudos publicados que refiram níveis de arsénio neste sistema estuarino, em qualquer compartimento biótico ou abiótico, apesar de outras indústrias do complexo químico serem responsáveis pela produção de 150 mil toneladas de resíduos de pirite, com níveis muito altos de arsénio. Publicações recentes indicam níveis elevadíssimos deste contaminante nos terrenos circundantes, nomeadamente nas margens do Esteiro de Estarreja onde os níveis chegam a atingir os 3000 - 10000 mg/kg (Costa and Jesus-Rydin, 2001, Marques et al., 2009). Dados da fracção dissolvida ou particulada da coluna de água são inexistentes, bem como para as comunidades biológicas, muitas delas recursos de valor económico explorados pelas populações locais.

Assim sendo, torna-se premente uma avaliação do estado de contaminação deste sistema por arsénio, tanto nos vários compartimentos abióticos como nas comunidades biológicas residentes.

1.9. Objetivos

Tendo em conta a informação apresentada anteriormente, os principais objectivos deste estudo são:

- Avaliação do estado de contaminação da Ria de Aveiro por arsénio através da quantificação da concentração de arsénio total nos sedimentos, águas e matéria particulada suspensa (SPM);
- Clarificação dos processos de bioacumulação de arsénio no bivalve *Scrobicularia plana* e determinação da taxa de acumulação anual deste contaminante em locais expostos a diferentes graus de contaminação ambiental;
- Avaliação da possível utilização desta espécie como biomonitor de contaminação de arsénio em ambiente estuarino.

2. Material e métodos

2.1. Locais de amostragem

A área da Ria de Aveiro escolhida para realizar a amostragem no âmbito deste estudo é um local reconhecido pela sua elevada contaminação com metais (Monterroso, 2004), fica situada no canal da Murtosa e é conhecida como Largo do Laranjo. O Largo do Laranjo é uma pequena bacia interior (cerca de 2 km²) que está ligado à ria por um canal estreito e possui um gradiente de salinidade bem definido entre água salgada proveniente da ria e água doce proveniente de rios e outras fontes de água, como efluentes industriais e domésticos (Coelho, 2009).

A escolha dos locais de amostragem foi feita com base numa amostragem preliminar, onde foi analisado o conteúdo de arsénio de sedimentos de 14 locais situados nos vários canais principais da Ria (Figura 3).

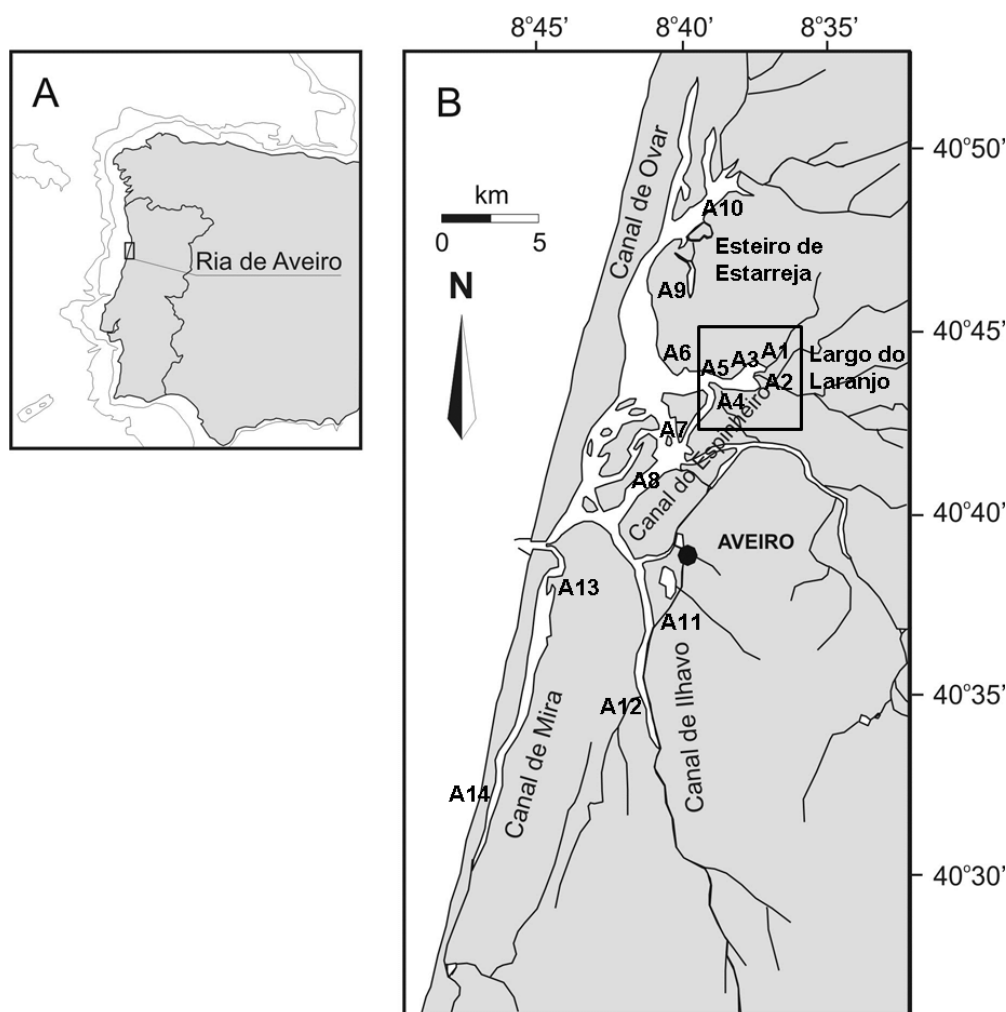


Figura 3 - Mapa da Ria de Aveiro com a localização dos pontos da amostragem preliminar.

Esta análise mostrou que os níveis de arsénio nos sedimentos da zona do Largo do Laranjo eram mais elevados do que no resto do sistema, apresentando um gradiente de contaminação semelhante ao observado para mercúrio (Figura 4).

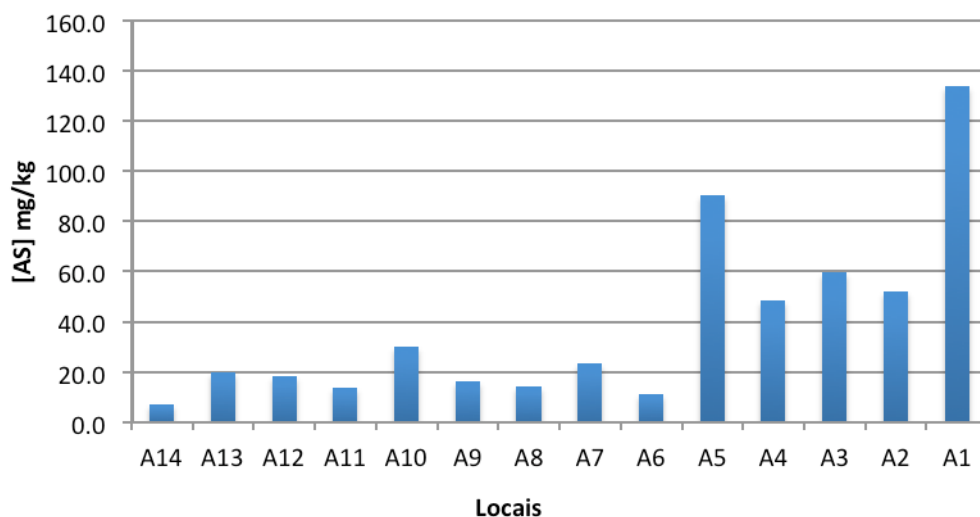


Figura 4 -Concentrações de arsénio total (mg/kg) em sedimentos de vários locais da Ria de Aveiro (amostragem preliminar).

Tendo em consideração os valores obtidos, os pontos escolhidos para locais de amostragem foram denominados de A1, A2, A3 e A5 a partir do fim do Esteiro de Estarreja, sendo o local A1 o mais próximo da embocadura (

Tabela 5). Como local de referência foi escolhido um local denominado A14 situado no canal de Mira, onde foram observados níveis residuais de contaminação.

Tabela 5 – Localização (coordenadas GPS) e distância dos locais de amostragem em relação à descarga de efluentes industriais.

Local de amostragem	Coordenadas GPS	Distância em relação à descarga de efluentes industriais (km)
A1	40°43'46.49"N; 8°36'38.58"W	0,2
A2	40°43'45.77"N; 8°36'59.61"W	0,8
A3	40°43'42.52"N; 8°37'42.10"W	2
A5	40°43'17.06"N; 8°38'8.22"W	3,7
A14	40°34'22.98"N; 8°45'9.55"W	22,1

2.2. Amostragem e preparação de amostras

As amostras para este trabalho foram recolhidas numa única campanha de amostragem efectuada em Novembro de 2010 em condição de maré vazante. Foram recolhidas amostras de água e de sedimentos para avaliar o grau de contaminação ambiental e amostras de amêijoas. Foram seguidos os procedimentos mais adequados para garantir que as amostras apresentassem a máxima representatividade. O risco de contaminação também foi evitado/diminuído, havendo o cuidado de manipular o mínimo possível as amostras durante a amostragem, preparação e análise das mesmas.

Todo o material de vidro usado na recolha e análise das amostras foi antecipadamente cheio com ácido nítrico concentrado (65%), submerso pelo menos 24 horas numa solução de ácido nítrico a 25%, lavado com água e submerso numa solução de ácido clorídrico 25% e, por fim, enxaguado com água ultra-pura (Millipore Milli-Q 185).

2.2.1. Amostras de água

As amostras de água (4 réplicas por local) foram recolhidas em garrafas de politereftalato de etileno (PET) previamente lavadas, no canal de água adjacente a cada local, sendo que no local A3 as réplicas foram recolhidas numa vala onde desaguava um efluente de origem desconhecida. Após amostragem, as amostras de água foram levadas para o laboratório em malas térmicas e, dentro de poucas horas, foram filtradas usando bomba de vácuo. A matéria particulada suspensa (SPM) foi recolhida em filtros de celulose de poro 0,45 μm que tinham sido pré-pesados. Os filtrados foram depois acidificadas com ácido nítrico concentrado até $\text{pH} < 2$ e armazenadas dentro de frascos de vidro a 4°C até análise. De modo a detectar a existência de uma possível contaminação durante a filtração, foram também filtradas duas réplicas de água ultra-pura e acidificadas com o mesmo procedimento utilizado para as amostras de água.

Os filtros utilizados nas filtrações foram secos na estufa a 50°C e armazenados para posterior análise da matéria particulada suspensa. Antes da análise foi necessário digerir os filtros e, para isso, procedeu-se a uma digestão ácida com água régia (uma mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico). Cada um dos filtros foi colocado numa bomba de Teflon onde foram adicionados 6 mL de HCl e 2 mL de HNO_3 concentrado. As bombas foram fechadas

e colocadas na estufa a 100°C durante uma hora. Depois disso, deixou-se arrefecer as bombas e o seu conteúdo foi transferido para balões volumétricos de 100 mL, aferidos com água Milli-Q. As soluções resultantes foram colocadas em frascos de plástico de 100 mL, devidamente rotulados, até ao momento da análise.

2.2.2. Amostras de sedimento

Em cada local de amostragem foram recolhidas 5 amostras de sedimentos superficiais (0 a 10 cm) para sacos de plástico. As amostras foram depois transportadas em malas térmicas para o laboratório, onde foram secas na estufa a 50°C até apresentarem peso constante. Depois foram homogeneizadas, peneiradas com uma peneira de malha de 1 mm e armazenadas em sacos de plástico devidamente rotulados. Antes da análise os sedimentos foram sujeitos a um processo de digestão e para isso foram colocados cerca de 200 mg de sedimento de cada réplica, 6 mL de HCl e 2 mL de HNO₃ em bombas de Teflon, repetindo-se o processo de digestão a que foram sujeitos os filtros para análise da matéria particulada.

2.2.3. Amostras biológicas

Tendo em conta a informação existente sobre o ciclo de vida da *Scrobicularia plana*, que indica um crescimento aproximado de 1 cm por ano (Verdelhos, 2003), as amêijoas foram divididas em 5 classes de acordo com o respectivo tamanho, sendo que cada classe tem um incremento de 1 cm.

A recolha das amêijoas das três classes maiores (2-3 cm; 3-4 cm; 4-5 cm) foi feita manualmente, enquanto a das duas classes menores (0-1 cm; 1-2 cm) foi feita transferindo sedimento para dentro de um saco de rede com malha de 500 µm, que depois foi agitado submerso em água até que apenas as partículas com tamanho superior a 500 µm ficassem retidas. O material retido foi armazenado em sacos de plástico e levado em malas térmicas para o laboratório, onde foi feita uma triagem para recolher as amêijoas das classes pretendidas.

No laboratório todas as amêijoas recolhidas foram deixadas durante 12 horas, ainda vivas, em água recolhida no local de amostragem, para que ocorresse a libertação de

sedimentos e outros materiais que se encontram no tubo digestivo dos organismos, processo conhecido por depuração.

Numa segunda fase, as amêijoas foram medidas e separadas em classes de tamanho, guardando-se, sempre que possível, mais de 5 exemplares de cada classe. No caso das classes menores (organismos mais pequenos) foram armazenados todos os exemplares. Posteriormente, as amêijoas foram retiradas do interior das conchas, com a ajuda de pinças, e foi medida a sua massa para, depois de liofilizadas, serem pesadas novamente e ser determinado o seu teor em humidade. Antes de serem analisadas, as amostras sofreram um processo de digestão que teve de ser previamente otimizado e que se encontra descrito na secção seguinte “Metodologias analíticas”.

2.3. Metodologias analíticas

2.3.1. Optimização do método de digestão

Uma parte relevante do trabalho realizado consistiu na optimização do método de digestão para matrizes biológicas que pudesse ser usado para quantificar adequadamente o arsénio nesta matriz. Uma das técnicas mais utilizadas na detecção de arsénio é a espectroscopia de fluorescência atómica com geração de hidretos, devido aos baixos limites de detecção conseguidos. Uma limitação desta técnica é a necessidade de todo o arsénio estar em formas geradoras de hidretos, mais precisamente em As (III), e a maior parte dos organismos possuir uma elevada percentagem de espécies orgânicas de arsénio (arsenobetaína, por exemplo) muito estáveis e que não são detectadas/quantificadas diretamente pela técnica referida anteriormente (Ringmann et al., 2002).

Para suprir esta limitação é necessário que as amostras sejam previamente digeridas, para que as espécies orgânicas sejam transformadas em espécies inorgânicas, capazes de reagir com NaBH_4 e gerar hidretos, de forma a poderem ser analisadas pela técnica mencionada. Para garantir que todas as formas orgânicas de arsénio são transformadas em espécies inorgânicas é necessário que o processo de digestão seja o mais eficiente possível e, para garantir essa eficiência, foram testados vários processos de digestão em diversos materiais de referência, de matriz semelhante à das amostras a analisar posteriormente, para avaliar a percentagem de recuperação de arsénio alcançada e consequente eficiência.

As metodologias de digestão utilizadas foram as seguintes:

Método A – Digestão em estufa com bombas de Teflon – Foram colocadas cerca de 50 mg de material de referência em cada bomba de Teflon e adicionados 4 mL de HNO_3 . As bombas foram fechadas e colocadas na estufa a 60°C durante 12 horas. Depois a temperatura foi aumentada para 100°C durante mais uma hora. Após este período deixou-se arrefecer as bombas, adicionou-se 2 mL de H_2O_2 e colocaram-se novamente as bombas na estufa, desta vez abertas e a 80°C . No final, transferiu-se o conteúdo das bombas para balões volumétricos de 100 mL e aferiu-se com água Milli-Q. As soluções foram depois guardadas em frascos de plástico até serem analisadas.

Método B – Digestão em microondas com HNO_3 – Foram colocadas cerca de 200 mg (massa máxima) de material de referência em vasos de Teflon de alta pressão (HP500Plus), adicionados a cada vaso 10 mL de ácido nítrico concentrado e deixou-se 15 minutos a repousar. Os vasos foram depois fechados e introduzidos num microondas de marca CEM, modelo MARS5, onde foram sujeitas a um programa de aquecimento, que consiste num período de 15 minutos com potência regulada para 800W até serem atingidas pressões na ordem dos 800 psi e temperaturas de cerca de 200°C , que se mantêm por mais 15 minutos. Depois de terminado o programa e após os vasos arrefecerem o suficiente para serem manipulados, o seu conteúdo foi transferido para balões volumétricos de 100 mL e estes aferidos com água Milli-Q. As soluções foram depois guardadas em frascos de plástico até serem analisadas.

Método C – Digestão em microondas com HNO_3 e H_2SO_4 – Foram colocados cerca de 200 mg de material de referência e 10 mL de HNO_3 em vasos de Teflon de alta pressão, que foram colocados no microondas a 250W durante 5 minutos. Depois a potência foi aumentada para 400W durante 10 minutos e após este período foram adicionados 5 mL de H_2SO_4 e a potência aumentada para 600W durante mais 10 minutos (Vilano and Rubio, 2001). O conteúdo dos vasos foi depois transferido para balões de 100 mL e aferiu-se com água ultra-pura. As soluções foram transferidas para frascos de plástico e guardadas até análise.

Método D – Digestão em microondas com NaF, Na₂S₂O₈ e HNO₃ – Foram colocadas cerca de 50 mg de material de referência em vasos de Teflon de alta pressão e adicionadas diferentes proporções de soluções saturadas de NaF e Na₂S₂O₈ e HNO₃ concentrado (65%), conforme se indica na Tabela 6.

Tabela 6 - Proporções de reagentes utilizados nos diferentes métodos de digestão D testados.

Método de digestão	Na ₂ S ₂ O ₈ (mL)	Na ₂ S ₂ O ₈ (g)	NaF (mL)	HNO ₃ (mL)
D1	3	---	6	0,5
D2	6	5	2	---
D3	6	---	2	0,2

Os vasos foram depois fechados e colocados no interior do microondas à potência de 800W durante cerca de 15 minutos, até se atingirem pressões na ordem dos 800 psi e temperaturas na ordem dos 200°C, condições estas que se mantiveram durante mais 15 minutos. As variações D1 e D3 do método sofreram um segundo passo de digestão, nas mesmas condições indicadas anteriormente, após terem sido adicionados mais 2 mL de Na₂S₂O₈ e 1 mL de NaF (Ringmann et al., 2002). Após este processo o conteúdo dos vasos foi transferido para balões volumétricos de 100 mL e aferiu-se com água ultra-pura. As soluções foram depois transferidas para frascos de plástico onde permaneceram até ao momento da análise.

2.3.2. Determinação do teor de arsénio total

As técnicas espectroscópicas que mais regularmente têm sido utilizadas para quantificação e especiação de arsénio em amostras ambientais são a absorção atómica com geração de hidretos (HG-AAS), a fluorescência atómica com geração de hidretos (HG-AFS), a espectrometria de massa com plasma indutivo (ICP-MS) e a espectrometria de fluorescência atómica com plasma indutivo (ICP-AFS) (Hung et al., 2004).

A técnica de espectroscopia de fluorescência atómica com geração de hidretos tem-se revelado bastante adequada, devido à sua boa sensibilidade, seletividade e simplicidade na determinação de elementos que formem hidretos voláteis (Fabiya et al., 2008), como é o caso do arsénio e, por isso, foi a técnica utilizada neste trabalho.

A técnica de geração de hidretos é um processo de derivatização química que produz hidretos voláteis de um determinado elemento, através do tratamento da amostra com um agente redutor em meio ácido, sendo os hidretos posteriormente detectados; a sua grande vantagem é a capacidade de separar o analito da amostra (Hung et al., 2004). Para detetar os hidretos gerados, umas das técnicas mais utilizadas é a espectrometria de fluorescência atómica, que tem como base o processo de fluorescência de átomos (Corns et al., 1993). A fluorescência atómica consiste na emissão de radiação fluorescente por átomos excitados que regressam ao seu estado fundamental e a energia emitida é proporcional à concentração do analito na amostra.

Componentes principais e funcionamento do método HG-AFS

O sistema de detecção por fluorescência atómica utilizado foi o PSA Millenium Excalibur (10,055). O equipamento é constituído por duas bombas peristálticas, uma que bombeia o agente redutor (tetrahydroborato de sódio, NaBH_4) e outra que bombeia a amostra ou o branco, produzindo assim um fluxo contínuo com geração de hidretos. Esta última bomba é controlada por uma válvula de comutação controlada electronicamente, que alterna a bombagem entre branco e amostra. Fazem ainda parte da constituição do aparelho uma célula separadora de gás líquido, uma chama, um sistema de secagem de gás, uma fonte de excitação constituída por uma lâmpada de cátodo oco e um detetor.

Na Figura 5 está representado o sistema de geração de hidretos que se processa em 3 etapas principais: a 1ª designada por tempo de atraso (10 segundos) na qual o branco entra

juntamente com o tetrahidroborato de sódio no separador gás-líquido para estabelecer uma linha de base; a 2ª designada tempo de análise (30 segundos) em que a válvula de comutação é ativada e a amostra é introduzida no separador gás-líquido com o NaBH₄, demorando 20 segundos para o sinal atingir o estado estacionário e mantendo-se assim por 10 segundos de forma a atingir a altura máxima de sinal; por fim, a 3ª etapa na qual a amostra é eliminada e o reagente branco é bombeado para o sistema durante 40 segundos.

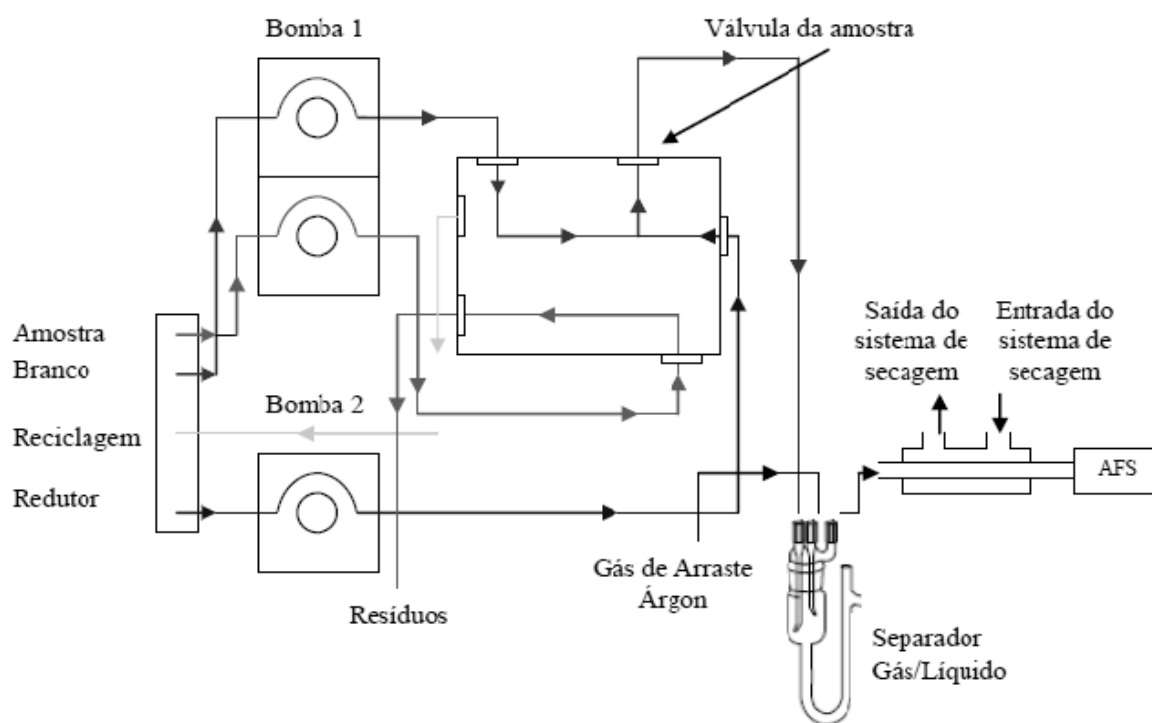


Figura 5 - Esquema do sistema de fluxo contínuo de geração de hidretos (Tavares, 2010).

Uma vez que o arsénio ocorre em dois estados de oxidação, As (III) e As (V) e esta técnica determina apenas o arsénio sobre a forma de As (III), é necessário converter todo o arsénio presente na amostra em As (III). Para reduzir o As (V) presente nas amostras em As (III), as amostras são deixadas reagir durante 30 minutos com uma solução ácida (30% v/v HCl, 1% m/v KI, 0.2% m/v ácido ascórbico). A concentração de arsénio total é determinada considerando que apenas existe em solução As (III) que vai reagir com o NaBH₄ formando hidretos voláteis.

Os hidretos que se formam são separados da fase gasosa no separador gás-líquido e arrastados pelo fluxo de árgon (300 mL/min) até ao sistema de secagem, onde o vapor de água é eliminado por um fluxo de ar K. Os hidretos são depois arrastados pelo fluxo de gás até ao atomizador, que consiste numa chama de árgon e hidrogénio que provém da reação do tetrahidroborato de sódio com o ácido clorídrico. Os átomos formados são excitados pela radiação proveniente da fonte de excitação (lâmpada de cátodo oco) e o sinal de fluorescência chega ao fotomultiplicador onde é registado, sendo a intensidade do sinal proporcional à concentração de arsénio na amostra.

De modo a avaliar o adequado funcionamento diário do equipamento usado na determinação de arsénio total, este foi calibrado com 5 soluções padrão (entre 0 e 2 µg/L) preparadas a partir de uma solução concentrada de arsénio (1000 mg/L); foi introduzido um padrão alternado entre cada 3 amostras para controlar o desvio de sinal do aparelho ao longo do dia.

Foram utilizadas neste trabalho uma solução contendo 30% v/v HCl, 1% m/v KI, 0.2% m/v ácido ascórbico e uma solução de NaBH₄ (0,7% m/v) em NaOH (0,4% m/v). As soluções foram preparadas diariamente e o NaBH₄ foi sempre filtrado. A solução de HCl é transferida para o equipamento a 8-10 mL/min e a solução de tetrahidroborato é bombeada a 4,5 mL/min.

2.4. Controlo de qualidade dos resultados

Qualquer método analítico envolve erros, desde a amostragem, armazenamento e tratamento das amostras, até ao processo de análise e tratamento de dados. Para minimizar esses erros, foram tomados todos os cuidados de forma a obter resultados o mais exatos e confiáveis. Parâmetros como a exatidão, precisão e limite de detecção foram quantificados com o objetivo de assegurar a “performance” do método analítico.

Precisão

A precisão avalia a dispersão entre os resultados obtidos para diferentes alíquotas da mesma amostra; todas as amostras foram analisadas em duplicado, para avaliar a precisão da quantificação de arsénio. Além disso, todas as amostras onde as alíquotas apresentaram um desvio médio relativo superior a 10% foram re-analisadas. O desvio médio nas

amostras de água foi de $1,7 \pm 1,5\%$ ($n=20$), nas amostras de sedimentos foi de $2,0 \pm 1,7\%$ ($n=25$), nas amostras de matéria particulada suspensa foi de $1,6 \pm 1,4\%$ ($n=20$) e nas amostras de amêijoia foi de $2,9 \pm 2,6\%$ ($n=93$).

Exatidão

A exatidão dos métodos analíticos utilizados foi avaliada através das percentagens de recuperação obtidas na análise de materiais de referência certificados (CRM) com matriz semelhante às amostras em análise. Para os sedimentos e matéria particulada suspensa foi usado como material de referência o Mess-3 (sedimento marinho), tendo-se obtido uma percentagem de recuperação média de $81,7 \pm 2\%$ ($n=4$); para a amêijoia foi utilizado o Nist-2976 (tecido de amêijoia) tendo-se obtido uma percentagem de recuperação média de $101 \pm 13\%$ ($n=18$). O processo de digestão e análise do material de referência foi conduzido em paralelo com as amostras. Os valores obtidos para os materiais de referência são comparados com os valores certificados na Tabela 7.

Tabela 7 – Valores obtidos e valores certificados para os materiais de referência usados na determinação das concentrações de arsénio total (valor médio \pm desvio padrão).

Material de referência	Valor certificado (mg/kg)	Valor obtido (mg/kg)	n
Mess-3	$21,2 \pm 0,6$	$17,3 \pm 1,6$	4
Nist-2976	$13,3 \pm 1,1$	$13,4 \pm 1,8$	18

Para o material de referência Nist-2976 não foram encontradas diferenças significativas (Teste Z, $P < 0.05$) entre o valor certificado e o valor obtido no laboratório. Para o material Mess-3 foram encontradas diferenças significativas (Teste Z, $P < 0.05$) entre o valor certificado e o valor obtido no laboratório. Esta diferença pode ser explicada pelo facto do material de referência se encontrar armazenado há algum tempo no laboratório, o que pode ter contribuído para a sua degradação e eventual perda de analito. No entanto, uma vez que se trata de uma metodologia com vários passos, uma percentagem de recuperação média de 81,7 %, foi considerada aceitável.

Limite de detecção analítico

O limite de detecção analítico (LOD) é a menor quantidade de substância a analisar que pode ser estatisticamente distinguida do ruído do sinal, da linha de base ou do nível do branco. O limite de detecção pode ser determinado de várias formas, consoante o método analítico utilizado (Miller and Miller, 2005). No método analítico utilizado para a determinação de arsénio total, o sinal dos brancos não se consegue distinguir do sinal da linha de base, por isso o limite de detecção foi estimado a partir dos parâmetros da recta de calibração. O limite de detecção obtido no método analítico utilizado foi de $0,04 \pm 0,01$ $\mu\text{g/L}$ e o limite de quantificação calculado foi de $0,08 \pm 0,02$ $\mu\text{g/L}$. Todos os valores abaixo do limite de quantificação foram eliminados e, sempre que possível, as análises repetidas.

3. Resultados

3.1.Otimização do método de digestão

Os resultados obtidos nos diversos testes de recuperação para os vários métodos de extração testados estão sumarizados na Tabela 8. Observando a eficiência de recuperação para as várias metodologias testadas, é possível perceber que o melhor método de digestão para fins de quantificação de arsénio total em amostras biológicas por espectroscopia de fluorescência atômica com geração de hidretos é o método D, onde são combinadas várias proporções de soluções saturadas de NaF e Na₂S₂O₈ e HNO₃ concentrado (65%), uma vez que é o método onde se verificaram maiores percentagens de recuperação em todos os materiais de referência. Os materiais de referência utilizados foram o BCR-279 (macroalgas), Dorm-2 (músculo de peixe), Dolt-3 (fígado de peixe), Tort-2 (hepatopâncreas de lagosta) e Nist-2976 (tecido de amêijoia).

Tabela 8 – Percentagens de recuperação (%) dos vários métodos de digestão testados em diferentes materiais de referência.

Métodos de digestão	Materiais de referência				
	BCR – 279	Dorm-2	Dolt-3	Tort-2	Nist-2976
A	---	4,7%	7,7%	8,6%	13,8%
B	88,7%	5,2%	3,2%	12,6%	---
C	---	---	---	6,3%	9,4%
D1	87,4%	94,0%	98,7%	83,8%	43,5%
D2	---	---	---	---	85,0%
D3	---	---	---	---	98,4%

Podemos verificar que no método D, a proporção de cada reagente usado influencia as percentagens de recuperação do material Nist-2976 (tecido de amêijoia). Isto demonstra que é necessário realizar testes preliminares neste tipo de metodologias, tendo o cuidado de escolher materiais de referência certificados com matriz o mais semelhante possível das amostras biológicas que se pretendem analisar.

O método escolhido para a digestão das amostras de amêijoia deste trabalho foi o método D3, uma vez que é o que apresenta a maior percentagem de recuperação para o material Nist-2976 (tecido de amêijoia).

3.2. Teor de arsénio total nas amostras recolhida na Ria de Aveiro

3.2.1. Amostras de água - arsénio dissolvido

A Figura 6 apresenta as concentrações de arsénio total ($\mu\text{g/L}$) dissolvido na água. Observando a Figura 6 é possível perceber que as concentrações de arsénio total dissolvido são maiores nos locais mais próximos da potencial “fonte de contaminação”, atingindo valores superiores a $5 \mu\text{g/L}$ no local A1. À medida que a distância em relação à fonte vai aumentando, as concentrações de arsénio vão diminuindo até valores inferiores a $2 \mu\text{g/L}$ nos locais A14 e A3. O local A3 apresenta os valores mais baixos, na ordem dos $0,5 \mu\text{g/L}$.

Foram observadas diferenças significativas (ANOVA, $F= 4434,320$, $P<0.001$) entre todos os locais de amostragem, provando que existe um gradiente de arsénio dissolvido desde a zona mais próxima da fonte (A1) até ao local mais afastado (A5). De referir que todos os valores obtidos estão abaixo do limite imposto pela legislação portuguesa no que diz respeito a águas para consumo humano, que é de $10 \mu\text{g/L}$.

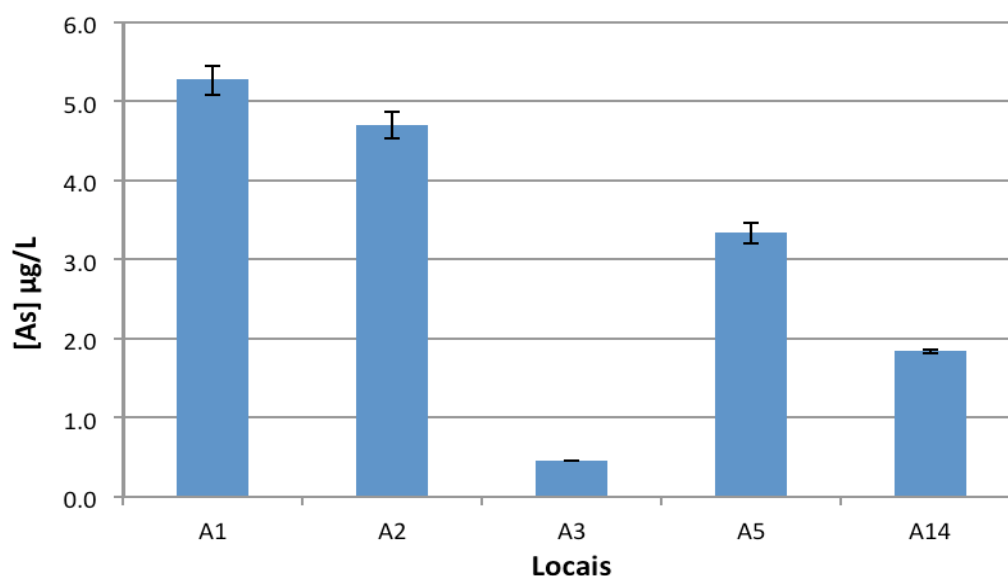


Figura 6 - Concentrações de arsénio total ($\mu\text{g/L}$) dissolvido na água. As barras de erro representam os desvios padrão.

3.2.2. Matéria particulada suspensa

A Figura 7 apresenta as concentrações de arsénio total (mg/kg) na matéria particulada suspensa. Tal como para a água, podemos verificar na Figura 7 que as concentrações de arsénio na matéria particulada suspensa são superiores nos locais mais próximos da potencial fonte de contaminação. Este compartimento abiótico foi o que apresentou os níveis de As total mais elevados de todas as matrizes estudadas, superando os 250 mg/kg nos locais A1 e A2 e diminuindo à medida que a distância ao local A1 aumenta, até valores de 30 mg/kg no local mais afastado (A14). Ao contrário do que se verificou na água, o local A3 segue o mesmo padrão que os outros locais, apresentando valores intermédios de concentração. Foram encontradas diferenças significativas (ANOVA, $F=335,340$, $P<0.001$) entre os locais de estudo, excepto entre o local A1 e A2 (Tukey post-hoc test, $q=1.87$, $P=0.685$).

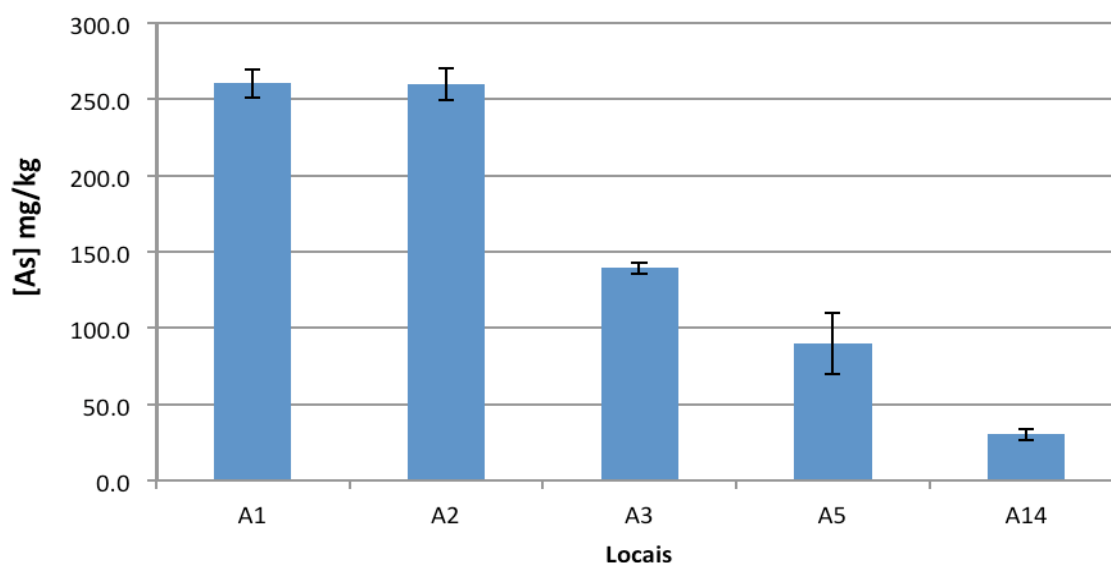


Figura 7 - Concentrações de arsénio total (mg/kg) na matéria particulada suspensa. As barras de erro representam os desvios padrão.

3.2.3. Sedimentos

A Figura 8 apresenta as concentrações de arsénio total (mg/kg) nos sedimentos. Os valores de arsénio total nos sedimentos seguem a mesma tendência dos obtidos para a água e a SPM, observando-se, mais uma vez, um decréscimo das concentrações à medida que nos afastamos do local mais contaminado. As concentrações variam entre 93,8 mg/kg no local A1, que corresponde à classe 3 de contaminação de material dragado (material ligeiramente contaminado) segundo a legislação portuguesa (Tabela 4), e um mínimo de 2,8 mg/kg no local de referência A14, correspondente à classe 1 de contaminação de material dragado (material não contaminado). De referir ainda que no local mais contaminado algumas réplicas apresentaram valores acima dos 100 mg/kg, atingindo a classe 4 de contaminação (material contaminado).

De realçar o facto das concentrações de arsénio decrescerem bastante do local A1 para o A2, separados apenas por 600 metros, passando de 93,8 mg/kg para cerca de metade (46 mg/kg). Foram encontradas diferenças significativas (ANOVA, $F=709,376$, $P<0.001$) entre as concentrações de arsénio de todos os locais.

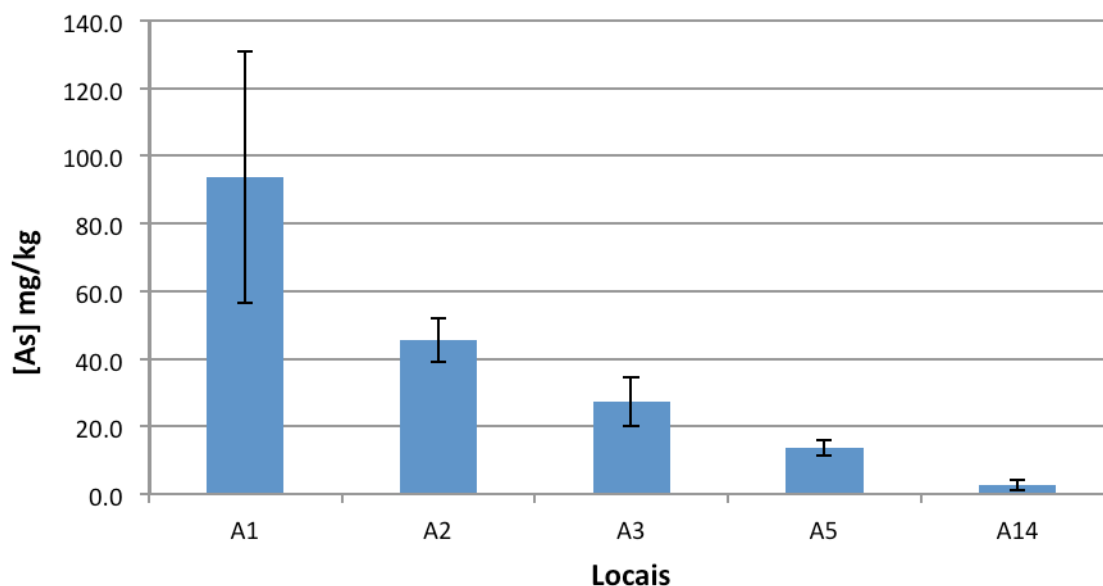


Figura 8 - Concentrações de arsénio total (mg/kg) nos sedimentos. As barras de erro representam os desvios padrão.

3.2.4. Amêijoas

A Figura 9 apresenta as concentrações de arsénio total (mg/kg, peso seco) nas amêijoas das cinco classes de tamanho nos locais de amostragem. A análise dos valores de arsénio total determinados nos indivíduos recolhidos nos diversos locais de amostragem permite verificar que o local de referência (A14) apresenta os valores mais baixos, oscilando entre 10,8 mg/kg na classe 3 de tamanho e 16,9 mg/kg na classe de tamanho 1. Os locais A1 e A2 são os que apresentam valores mais elevados, com concentrações acima dos 30 mg/kg nas classes de tamanho 1 e 2. Os locais A3 e A5 apresentam concentrações intermédias entre os locais próximos da fonte e o local de referência. Foram encontradas diferenças significativas (ANOVA on Ranks, $P < 0.05$) entre os locais mais contaminados (A1 e A2) e o local de referência A14.

Para fazer uma análise mais detalhada aos valores de arsénio em todas as classes de tamanho e locais foram feitas ANOVAS não-paramétricas, de forma a identificar diferenças significativas dentro de cada local e dentro de cada classe. Optou-se por este teste estatístico não-paramétrico, porque os resultados não seguem uma distribuição normal e a matriz de resultados obtidos apresentava um número de valores desigual para algumas classes (não foi possível obter 5 valores para cada classe de cada local, devido ao facto de terem sido recolhidos poucos indivíduos de classe 1 e as suas massas serem muito reduzidas, o que só permitiu obter uma réplica por cada local e alguns valores da classe 2 estavam abaixo do limite de detecção, nomeadamente nos locais A3 e A14). Os valores obtidos para classe 1 não foram utilizados na realização das ANOVAS.

A partir dos testes estatísticos efectuados foi possível verificar que dentro de cada local, apenas se verificam diferenças significativas (ANOVA on Ranks, $P < 0.05$) entre as classes 5 e 3 e as classes 4 e 3 nos locais A14 e A3 e entre as classes 5 e 3 e classes 5 e 2 nos locais A1, A2 e A5. No que diz respeito a diferenças entre locais dentro de cada classe de tamanho, em todas elas foram encontradas diferenças significativas (ANOVA on Ranks, $P < 0.05$) entre os locais A1 e A14, A2 e A14, A3 e A14 e locais A2 e A5. Ou seja, foram apenas detectadas diferenças significativas entre os locais mais contaminados (A1, A2 e A3) e o local de referência (A14) e entre o local A2, o mais contaminado, e o local A5, que é o mais próximo do local de referência. Entre locais adjacentes e classes de tamanho consecutivas não foram encontradas diferenças significativas.

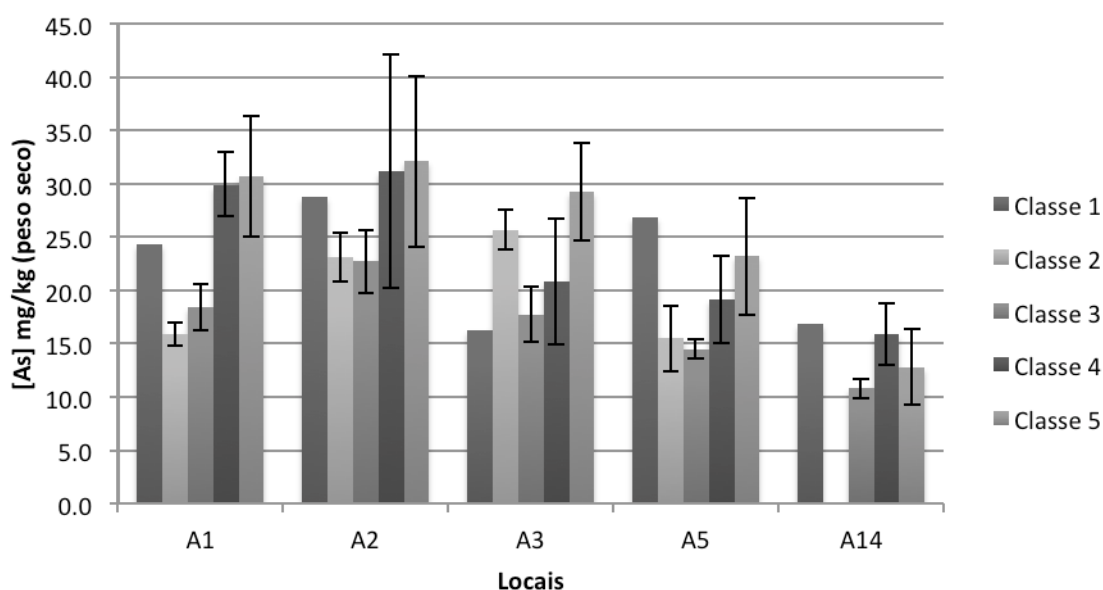


Figura 9 - Concentrações de arsénio total (mg/kg, peso seco) nas amêijoas das cinco classes de tamanho nos locais de amostragem. As barras de erro representam os desvios padrão.

Tendo em conta as condicionantes observadas para as classes de tamanho mais pequenas (a existência de apenas uma réplica da classe 1 para cada local e o facto de a maioria dos valores da classe 2 do local A3 e a totalidade dos mesmos no local A14 se encontrarem abaixo do limite de detecção), optou-se por excluir estes valores das análises subsequentes, de forma a obter resultados mais robustos e confiáveis.

Na Figura 10 podemos observar uma comparação das concentrações de arsénio nas classes de tamanho 3, 4 e 5 com as concentrações determinadas para a SPM e, apesar de não se verificarem diferenças significativas entre locais adjacentes e classes consecutivas, é claramente visível um padrão de contaminação que indica um decréscimo das concentrações de arsénio à medida que nos afastamos dos locais mais próximos da possível fonte de contaminação (A1 e A2) e um aumento das concentrações de arsénio na classe de tamanho 3 até à classe 5 em todos os locais, à exceção do local A14. Neste local (A14), tendo em conta a reduzida contaminação ambiental, é de esperar que a contaminação nos organismos em estudo corresponda à condição natural, com oscilações inerentes à variabilidade biológica natural, e que não se verifique bioacumulação ou ocorra bioacumulação residual com a idade dos organismos.

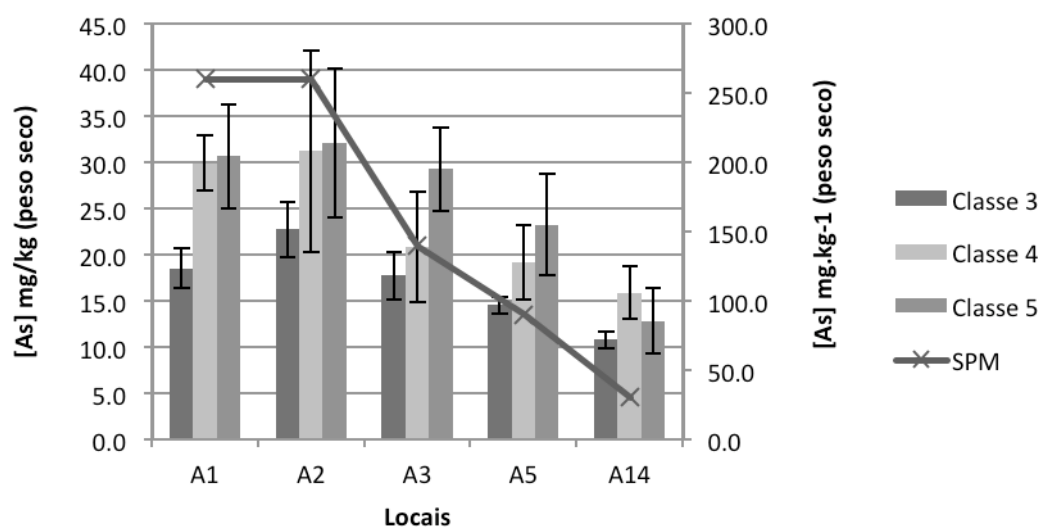


Figura 10 - Comparação das concentrações de arsénio total (mg/kg, peso seco) nas amêijoas das classes de tamanho 3, 4 e 5 e na SPM nos locais de amostragem. As barras de erro representam os desvios padrão.

É ainda possível perceber que os diversos locais apresentam um padrão semelhante de variação da concentração ao observado para a SPM, que corresponderá à fonte primária de alimento para estes organismos.

3.2.5. Taxa de bioacumulação anual de arsénio na amêijoa

As quantidades de arsénio total nos indivíduos analisados permitem determinar as taxas de bioacumulação da espécie ao longo da sua vida em ambientes com diferentes graus de contaminação. As taxas de bioacumulação podem ser obtidas a partir do declive das rectas obtidas para a regressão linear da contaminação dos indivíduos ao longo da vida. Os dados da Figura 11 mostram que as taxas de bioacumulação de arsénio aumentam com o grau de contaminação ambiental; como se pode observar, a taxa do local A1 (5,6 mg/kg ano), o local mais contaminado, é quase 6 vezes superior à taxa do local de referência A14 (1 mg/kg ano). Os locais A2 e A3 apresentam também taxas de bioacumulação elevadas, comparáveis às observadas para o local A1, enquanto o local A5, com contaminação intermédia, apresenta valores intermédios para a taxa de bioacumulação anual.

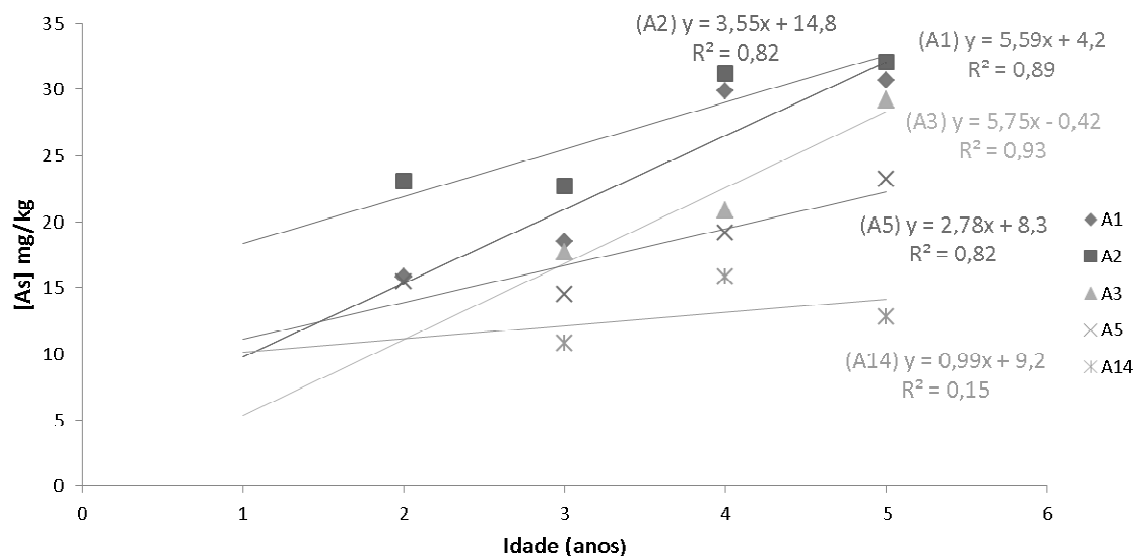


Figura 11 – Concentração total de arsénio (mg/kg) para amêijoas pertencentes a diferentes classes de tamanho e para os diversos locais amostrados. O declive das linhas de tendência corresponde à taxa de acumulação anual de arsénio para cada local de estudo.

De referir os valores elevados do coeficiente de correlação (R^2) obtidos para a relação entre as concentrações de arsénio na amêijoia e a idade das mesmas para todos os locais, excepto para o local de referência, corroborando a ideia de que neste local os processos de bioacumulação são inexistentes ou muito reduzidos.

3.2.6. Factores de bioconcentração de arsénio

Para avaliar a viabilidade da utilização da amêijoia como biomonitor da contaminação ambiental de arsénio na Ria de Aveiro, foram calculados os factores de bioconcentração de arsénio para os diferentes compartimentos ambientais (sedimentos (Figura 12), SPM (Figura 13) e água (Figura 14)).

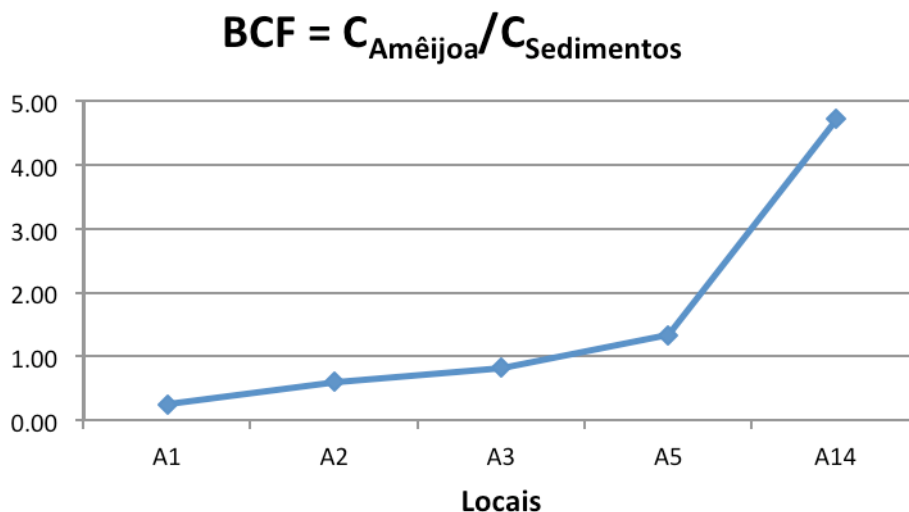


Figura 12 - Factores de bioconcentração de arsénio para os sedimentos dos diversos locais amostrados.

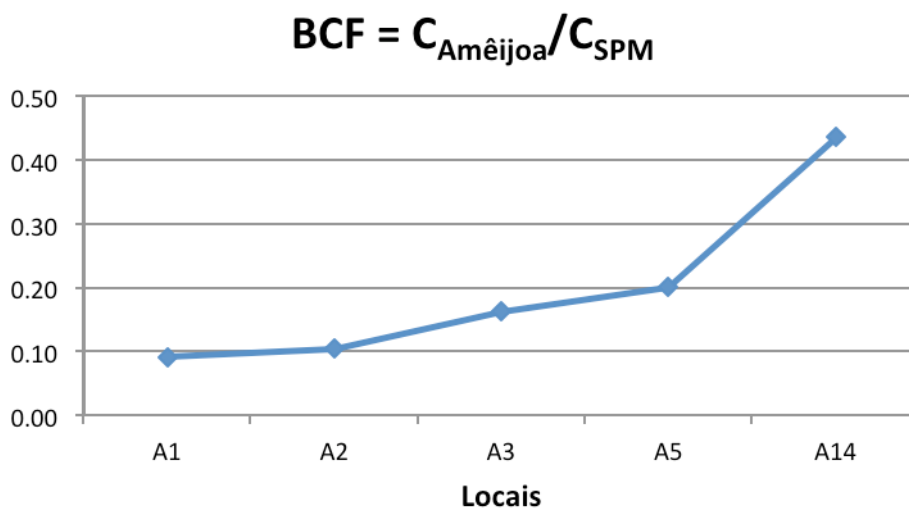


Figura 13 - Factores de bioconcentração de arsénio para a SPM dos diversos locais amostrados.

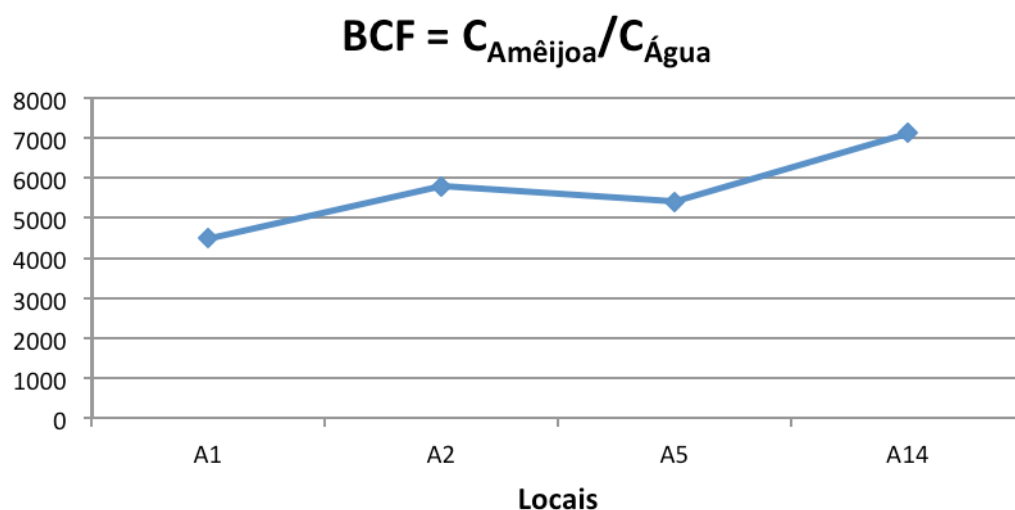


Figura 14 - Factores de bioconcentração de arsénio para a água dos diversos locais amostrados.

Os resultados obtidos para os sedimentos (Figura 12) e SPM (Figura 13) apresentam um padrão semelhante de variação, onde podemos verificar que os factores de bioconcentração aumentam à medida que nos afastamos da fonte de contaminação. No caso da água (Figura 14) os factores de bioconcentração não denotaram um aumento acentuado com a distância à fonte de contaminação. Na Figura 14 não foram introduzidos os valores do local A3, uma vez que estes não correspondem a água da Ria, mas sim de um tributário cuja origem difere do foco de contaminação, e como tal os níveis de contaminação não refletem a sua posição intermédia no gradiente de contaminação.

3.2.7. Relação entre as concentrações de arsénio na amêijoa e nos diversos compartimentos ambientais

Para avaliar a resposta da amêijoa ao gradiente de contaminação ambiental foram calculadas as regressões lineares entre a concentração de arsénio na amêijoa e nos três compartimentos ambientais estudados (água, sedimentos e SPM, Tabela 9).

Tabela 9 - Regressões lineares entre as concentrações de arsénio nas diversas matrizes analisadas. Os valores da tabela referem-se ao parâmetro R^2 .

	Amêijoa	Sedimentos	SPM	Água
Amêijoa	---	0,457	0,867	0,849
Sedimentos	---	---	0,763	0,815
SPM	---	---	---	0,936
Água	---	---	---	---

Apenas as regressões entre as concentrações de arsénio na amêijoa e a SPM e na água e SPM são significativas ($P < 0.05$). As restantes regressões calculadas não são estatisticamente significativas, o que significa que a contaminação de amêijoa por arsénio não depende das concentrações do mesmo nos sedimentos e na água.

4. Discussão dos resultados

Discussão dos resultados

A técnica analítica escolhida para a quantificação de arsénio (HG-AFS) tem a vantagem de permitir limites de detecção baixos para o arsénio (na gama dos ng/L), e tem aplicação em diversos ramos do conhecimento como seja a monitorização ambiental, análise de alimentos ou controlo de efluentes industriais. Contudo, alguns compostos orgânicos de arsénio apresentam elevada estabilidade química, originando dificuldades na sua transformação quantitativa em formas geradoras de hidretos durante o pré-tratamento das amostras. Isto é válido não apenas para o caso da arsenobetaína, um composto importante em peixes e espécies marinhas, mas também para compostos tóxicos tais como o ácido fenilarsónico ou o cloreto de tetrafenilarsónio. Deste modo, a eficiência do processo de digestão é da maior importância para a correta determinação de arsénio usando esta método analítico (Ringmann et al., 2002). A optimização do processo de digestão foi, assim, uma etapa importante deste trabalho, pois permitiu perceber como transformar adequadamente espécies orgânicas de arsénio em espécies inorgânicas, de forma a serem detectadas pelo método de espectroscopia de fluorescência atómica com geração de hidretos. Os métodos de tratamento das amostras A, B e C não se mostraram eficientes para a digestão de tecidos de amêijoas, uma vez que apresentaram percentagens de recuperação baixas. Foram testadas três variantes do método D de acordo com Ringmann (2002) e percebeu-se que a eficiência do método está dependente da matriz da amostra. Exemplo disso é a variante D1 que se mostrou eficiente na digestão de todas as matrizes testadas, à exceção da amêijoas que era a matriz relevante para este trabalho. Além da matriz da amostra, conclui-se também que a eficiência do método de digestão está dependente da proporção dos reagentes utilizados. Com base nos resultados obtidos, todas as amostras foram digeridas recorrendo à metodologia D3, onde a eficiência foi máxima.

Os resultados obtidos neste trabalho indicam que a contaminação da Ria de Aveiro por arsénio se observa preferencialmente na zona do Largo do Laranjo, não havendo concentrações preocupantes na área a jusante do Cais do Chegado. Estes resultados estão de acordo com os resultados conhecidos para contaminação desta zona com mercúrio (Pereira et al., 2009) porque, embora a fonte de contaminação tenha origens diferentes (Uniteca no caso do mercúrio e Quimigal no caso do arsénio), o local de descarga dos efluentes contaminados é o mesmo, e fica situado no Esteiro de Estarreja (Costa and Jesus-Rydin, 2001), o que leva a que o gradiente de contaminação para ambos os metais seja

semelhante. Observou-se que o gradiente de contaminação com arsénio da Ria é visível em todos os compartimentos ambientais estudados (sedimentos, SPM e água) uma vez que foram encontradas diferenças significativas na concentração entre os locais de estudo.

Nos sedimentos e na SPM verifica-se o mesmo padrão de variação das concentrações, embora as concentrações presentes na SPM sejam superiores às encontradas nos sedimentos. Estes valores mais elevados na SPM podem ter várias causas, entre as quais o facto de haver transporte de partículas pelas correntes de água das zonas de maior contaminação a montante, reflectidas nas elevadas concentrações observadas nas margens do Esteiro de Estarreja (Costa and Jesus-Rydin, 2001, Marques et al., 2009). Assim sendo, as partículas em suspensão teriam origem em zonas mais contaminadas, apresentando por isso níveis mais elevados de arsénio do que os observados nos sedimentos. O facto de o arsénio ter grande afinidade por partículas mais finas, que se encontram em suspensão mais tempo no meio aquático também pode explicar estes valores, uma vez que o lixiviamento dos leitos provocado pelas correntes pode promover a ressuspensão de partículas, levando a um enriquecimento por arsénio da coluna de água (Pereira et al., 2008). Há ainda a possibilidade destas concentrações mais elevadas na SPM se deverem à capacidade que o plâncton tem para bioacumular arsénio, especialmente na Primavera e no Outono, quando o seu crescimento é mais rápido, aumentando assim as concentrações de arsénio na SPM (Pereira et al., 2007).

Embora as concentrações de arsénio nos sedimentos sejam inferiores às da SPM, nos locais mais contaminados (A1 e A2) continuam a ser muito elevadas comparando com as encontradas por Hedouin (2009b) em vários locais de bacias hidrográficas havaianas, onde as concentrações não ultrapassam os 20 mg/kg à exceção de um local onde se verificaram concentrações na ordem dos 70 mg/kg. Noutro estudo (Hedouin et al., 2009a) na lagoa da Nova Caledónia, as concentrações de arsénio nos sedimentos da maioria dos locais também não ultrapassaram os 10 mg/kg e apenas um local apresentou valores próximos de 50 mg/kg. Valores semelhantes ao deste estudo foram obtidos no Golfo Pérsico onde as concentrações de arsénio nos sedimentos não ultrapassaram os 10 mg/kg (de Mora et al., 2004). Em Portugal, no estuário do Sado, as concentrações também não ultrapassam os 30 mg/kg (Caeiro, 2004, Costa et al., 2009), valores semelhantes aos determinados para os locais menos contaminados (A5, A3 e A14); no estuário do Tejo as concentrações não ultrapassam os 48 mg/kg (Caetano and Vale, 2002), valores semelhantes aos obtidos a

partir do local A2 até ao local de referência, o que evidencia a elevada contaminação do local mais próximo da fonte de contaminação (A1).

No que diz respeito às concentrações de arsénio dissolvido na coluna de água, verificou-se que todas as amostras analisadas estavam abaixo do limite estipulado por lei para águas de consumo humano, refletindo a grande afinidade do arsénio pelas partículas em suspensão. Estes valores estão de acordo com as concentrações de arsénio presentes em água da barragem do Alqueva, onde as concentrações não ultrapassaram os 9 µg/L (Palma et al., 2010). Verificou-se que o local A3 apresenta um valor inferior a todos os outros locais, contrariando o gradiente observado para os sedimentos e SPM. Uma explicação plausível para este resultado, é que as amostras deste local não foram recolhidas no canal principal da Ria, mas numa vala um pouco mais afastada onde desaguava um efluente de origem desconhecida que, segundo estes dados, terá uma fonte distinta da fonte de contaminação considerada (o Esteiro de Estarreja). Uma vez que os valores na água não seguem o gradiente de contaminação observado nos sedimentos e na SPM, não foram considerados no cálculo dos factores de bioconcentração.

No que diz respeito às concentrações de arsénio total na amêijoia, estas podem considerar-se elevadas, com indivíduos das classes de tamanho maiores a apresentarem níveis acima dos 40 mg/kg. Estes valores são superiores aos encontrados em mexilhão do mar Adriático (Fattorini et al., 2008) e semelhantes aos obtidos por Mora (2004) em bivalves do Golfo Pérsico, mas consideravelmente mais baixos do que os níveis encontrados no molusco *Gafrarium tumidum* das bacias de Nova Caledónia, onde se registaram valores superiores a 400 mg/kg (Hedouin et al., 2009a). Foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de arsénio na amêijoia apenas entre os locais mais contaminados (A1, A2 e A3) e o local de referência A14 (Figura 9); fazendo uma análise geral local a local, só foram encontradas diferenças significativas entre as classes 4 e 5 e a classe 3. Isto dever-se-á essencialmente à elevada variabilidade observada dentro de cada local e classe de tamanho, reflectida nas barras de erro associadas a cada classe de tamanho, algo inerente a estudos envolvendo organismos vivos.

Globalmente verificou-se que, ao contrário do observado anteriormente para o mercúrio (Coelho et al., 2006), não houve um aumento gradual das concentrações de arsénio ao longo do ciclo de vida do bivalve. Os valores mais elevados observados para a classe 1 de todos os locais e da classe 2 do local A3 são os principais responsáveis por este

desvio face ao comportamento esperado. No entanto, estes resultados poderão dever-se a limitações metodológicas, e não propriamente à existência de um padrão ambiental. Por um lado, devido à baixa abundância de indivíduos de classe 1 nos locais de amostragem e às suas massas diminutas, apenas foi possível analisar uma amostra composta de classe 1, o que diminui consideravelmente a robustez dos resultados dessa mesma classe. Por outro lado, no que diz respeito às réplicas da classe 2, verificaram-se também problemas de natureza analítica, pois as massas individuais destas réplicas eram muito reduzidas, o que originou que todas as réplicas do local A14 e três das cinco réplicas do local A3 apresentaram concentrações de arsénio abaixo do limite de detecção, estando as restantes duas réplicas do local A3 muito próximo do limiar analítico de quantificação.

Assumindo as classes 1 e 2 como valores de concentração menos confiáveis, analisou-se o padrão de acumulação de arsénio nesta espécie tendo em conta só as classes de tamanho superiores (Figura 10). Para estas classes de tamanho, os locais A1 e A2 apresentam valores semelhantes, com concentrações máximas de arsénio a rondar 30 mg/kg nas classes 4 e 5, observando-se depois uma diminuição gradual das concentrações à medida que nos afastamos da fonte de contaminação, até valores abaixo de 15 mg/kg no local de referência A14. Apesar de estatisticamente não significativas, devido à grande variabilidade intra-específica, para cada local é possível verificar que existe um padrão de aumento das concentrações de arsénio com o tamanho do organismo, sugerindo um processo de bioacumulação ao longo do ciclo de vida destes organismos. No local A14, esta tendência não se verifica, muito provavelmente devido às baixas concentrações de arsénio existentes no local, levando a que os processos de bioacumulação sejam residuais ou não se verifiquem e que as variações observadas entre classes de tamanho correspondam apenas à variabilidade natural associada a esta espécie.

Na Figura 10, são comparados os valores de concentração de arsénio obtidos para a amêijoia com os obtidos para a matéria particulada suspensa e, como se pode observar, ambos apresentam o mesmo padrão de variação da contaminação. Esta observação é complementada com a análise das regressões lineares efectuadas entre as concentrações na amêijoia e nos diferentes compartimentos ambientais em estudo (sedimentos, água e SPM), que revela existir uma correlação significativa entre as concentrações na amêijoia e na SPM, e não entre as concentrações na fracção dissolvida e nos sedimentos, levando a crer que a SPM é a principal via de entrada de arsénio nos organismos desta espécie. Este

resultado está de acordo com o que foi observado para o mercúrio (Coelho et al., 2006), e reflete o comportamento alimentar da espécie, uma vez que a alimentação deste bivalve é feita através de um sifão que sonda continuamente a superfície dos sedimentos, filtrando os detritos depositados na interface sedimento-água, ingerindo desta forma a matéria particulada recentemente depositada. Deste modo, os níveis de arsénio na SPM serão um reflexo mais fiel da contribuição dietética de arsénio para esta espécie do que a contaminação sedimentar, eventualmente pelo facto de esta integrar a concentração de arsénio dos primeiros 10 cm de sedimento (camada amostrada) e não apenas a camada mais superficial.

O estudo revela que as amêijoas bioacumulam arsénio e que a concentração deste contaminante nos seus tecidos depende da sua disponibilidade no ambiente e da idade do organismo. Esta afirmação tem como base os resultados da Figura 11 onde são apresentadas as taxas de bioacumulação de arsénio nos diferentes locais ao longo da vida da amêijoia. A taxa de bioacumulação é dada pelo declive de cada recta e indica a concentração de arsénio em mg/kg que as amêijoas acumulam ao longo de um ano. Como se pode observar, a taxa do local A1 (5,6 mg/kg ano), o local mais contaminado, é quase 6 vezes superior à taxa do local de referência A14 (1 mg/kg ano) sendo que, de uma forma geral, a taxa de acumulação anual diminuiu com a distância ao foco de contaminação. Esta tendência é semelhante à observada para o mercúrio no mesmo sistema (Coelho et al., 2006), embora as taxas de acumulação anuais de arsénio sejam consideravelmente superiores, resultado das diferentes condições de referência para cada um dos contaminantes (o arsénio é um elemento naturalmente mais abundante na Natureza). Este comportamento poderia indiciar que esta espécie seria eficiente para refletir os níveis de contaminação ambiental, e dessa forma a sua possível utilidade como biomonitora dos níveis de arsénio na Ria de Aveiro. No entanto, a amêijoia não revelou ser um bom biomonitor para o arsénio na Ria de Aveiro, uma vez que se verificam aumentos nos factores de bioconcentração à medida que nos afastamos do local mais próximo da fonte de contaminação, para os três compartimentos ambientais (SPM, sedimentos e fracção dissolvida). Este comportamento indicia que a acumulação de arsénio nesta espécie não é um processo passivo, podendo ser regulada pelos organismos e dependendo do nível de contaminação, muito provavelmente através de mecanismos de defesa. Deste modo, em locais de baixa contaminação a bioacumulação poderá ser passiva, mas quando os níveis de

contaminação ambientais aumentam, os organismos poderão despoletar mecanismos de defesa para evitar a entrada e toxicidade dos contaminantes, como seja a produção de metalotioninas (Coelho et al., 2006). Assim sendo, e tendo em conta que para um organismo ser um bom biomonitor é desejável que os fatores de bioconcentração se mantenham constantes, independentemente do nível de contaminação do meio envolvente, a espécie *Scrobicularia plana* não poderá ser considerada um bom biomonitor da contaminação ambiental de arsénio na Ria de Aveiro.

5. Conclusões

Conclusões

Com este estudo podemos concluir que a contaminação da Ria de Aveiro por arsénio é mais evidente na zona do Largo do Laranjo e é visível em todos os compartimentos ambientais estudados (sedimentos, SPM e água), embora esteja mais relacionada com os sedimentos e a SPM. Os níveis de arsénio encontrados na água não são alarmantes e não apresentam risco para a saúde humana, uma vez que estão abaixo dos valores estabelecidos pela legislação portuguesa (10 µg/L).

O estudo revela que as amêijoas bioacumulam arsénio e que a concentração deste contaminante nos seus tecidos depende da sua disponibilidade no ambiente e da idade do organismo. As concentrações de arsénio na amêijoas são mais elevadas quanto mais elevado for o nível de contaminação do meio ambiente e este aumento apresenta uma relação bastante significativa com as concentrações de arsénio na matéria particulada em suspensão, deduzindo-se que a SPM seja a principal via de entrada de arsénio no organismo da amêijoas. A taxa de acumulação de arsénio varia consoante a contaminação do meio envolvente, apresentando um valor de 5,6 mg/kg ano no local A1, quase seis vezes superior ao observado no local A14 (1 mg/kg ano).

A amêijoas não poderá ser considerada um bom biomonitor de contaminação por arsénio na Ria de Aveiro, uma vez que não cumpre com todos os requisitos necessários, nomeadamente pelo facto de os fatores de bioconcentração variarem consoante os níveis de contaminação do meio envolvente.

6. Referências bibliográficas

Referências bibliográficas

- AGUSA, T., TAKAGI, K., IWATA, H. & TANABE, S. 2008. Arsenic species and their accumulation features in green turtles (*Chelonia mydas*). *Marine Pollution Bulletin*, 57, 782-789.
- AKEREDOLU, F. A., BARRIE, L. A., OLSON, M. P., OIKAWA, K. K., PACYNA, J. M. & KEELER, G. J. 1994. The flux of Anthropogenic Trace-metals into the Arctic from the midlatitudes in 1979/80. *Atmospheric Environment*, 28, 1557-1572.
- AZCUE, J. M. & NRIAGU, J. O. 1994. Arsenic: Historical perspectives. In: NRIAGU, J. O. (ed.) *Arsenic in the Environment*. New York: Wiley-Interscience
- BARWICK, M. & MAHER, W. 2003. Biotransference and biomagnification of selenium copper, cadmium, zinc, arsenic and lead in a temperate seagrass ecosystem from Lake Macquarie Estuary, NSW, Australia. *Marine Environmental Research*, 56, 471-502.
- BHUMBLA, D. K. & KEEFER, R. F. 1994. Arsenic mobilization and bioavailability in soils. In: NRIAGU, J. O. (ed.) *Arsenic in the Environment*. New York: Wiley-Interscience.
- BOYLE, R. W. & JONASSON, I. R. 1973. The geochemistry of arsenic and its use as an indicator element in geochemical prospecting. *Journal of Geochemical Exploration*, 2, 251-296.
- BYRNE, P. A. & O'HALLORAN, J. 1999. Aspects of assaying sediment toxicity in Irish estuarine ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 39, 97-105.
- BYRNE, P. A. & O'HALLORAN, J. 2001. The role of bivalve molluscs as tools in estuarine sediment toxicity testing: a review. *Hydrobiologia*, 465, 209-217.
- CAEIRO, S. 2004. *Environmental data management in the Sado Estuary: weight of evidence to assess sediment quality*. Tese de Doutoramento, Universidade Nova de Lisboa.
- CAETANO, M. & VALE, C. 2002. Retention of arsenic and phosphorus in iron-rich concretions of Tagus salt marshes. *Marine Chemistry*, 79, 261-271.
- CHILVERS, D. C. & PETERSON, P. J. 1987. Global cycling of arsenic.
- COELHO, J. P. 2009. *Mercury bioaccumulation in various trophic compartments: the Ria de Aveiro case study*. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro.
- COELHO, J. P., LILLEBØ, A. I., PACHECO, M., PEREIRA, M. E., PARDAL, M. A. & DUARTE, A. C. 2009. Biota Analysis as a Source of Information on the State of

- Aquatic Environments. In: NAMIESNIK, J. & SZEFER, P. (eds.) *Analytical Measurements in Aquatic Environments*. Boca Raton: CRC Press.
- COELHO, J. P., ROSA, M., PEREIRA, E., DUARTE, A. & PARDAL, M. A. 2006. Pattern and annual rates of *Scrobicularia plana* mercury bioaccumulation in a human induced mercury gradient (Ria de Aveiro, Portugal). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 69, 629-635.
- COLES, D. G., RAGAINI, R. C., ONDOV, J. M., FISHER, G. L., SILBERMAN, D. & PRENTICE, B. A. 1979. Chemical studies of stack fly-ash from a coal-fired power-plant. *Environmental Science & Technology*, 13, 455-459.
- CORNS, W. T., STOCKWELL, P. B., EBDON, L. & HILL, S. J. 1993. Development of an atomic fluorescence spectrometer for the hydride-forming elements. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 8, 71-77.
- COSTA, C. & JESUS-RYDIN, C. 2001. Site investigation on heavy metals contaminated ground in Estarreja - Portugal. *Engineering Geology*, 60, 39-47.
- COSTA, P. M., DINIZ, M. S., CAEIRO, S., LOBO, J., MARTINS, M., FERREIRA, A. M., CAETANO, M., VALE, C., DELVALLS, T. A. & COSTA, M. H. 2009. Histological biomarkers in liver and gills of juvenile *Solea senegalensis* exposed to contaminated estuarine sediments: A weighted indices approach. *Aquatic Toxicology*, 92, 202-212.
- CULIOLI, J. L., CALENDINI, S., MORI, C. & ORSINI, A. 2009. Arsenic accumulation in a freshwater fish living in a contaminated river of Corsica, France. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 1440-1445.
- DE MORA, S., FOWLER, S. W., WYSE, E. & AZEMARD, S. 2004. Distribution of heavy metals in marine bivalves, fish and coastal sediments in the Gulf and Gulf of Oman. *Marine Pollution Bulletin*, 49, 410-424.
- ESSINK, K., BEUKEMA, J. J., COOSEN, J., CRAEYMEERSCH, J. A., DUCROTOY, J. P., MICHAELIS, H. & ROBINEAU, B. 1991. *Population-dynamics of the bivalve mollusk Scrobicularia plana - comparisons in time and space*, Viborg, Olsen & Olsen.
- EUROPEAN COMMISSION, D. E. 2000. Ambient air pollution by As, Cd and Ni compounds. Brussels.
- FABIYI, F. A. S., SILEO, M. A. & AREMU, O. A. 2008. Hydride Generation Atomic Absorption Spectrophotometry Method for the Determination of Arsenic at Ultramicro Levels. *Synthesis and Reactivity in Inorganic Metal-Organic and Nano-Metal Chemistry*, 38, 727-730.
- FATTORINI, D., NOTTI, A., DI MENTO, R., CICERO, A. M., GABELLINI, M., RUSSO, A. & REGOLI, F. 2008. Seasonal, spatial and inter-annual variations of

- trace metals in mussels from the Adriatic sea: A regional gradient for arsenic and implications for monitoring the impact of off-shore activities. *Chemosphere*, 72, 1524-1533.
- FRANCESCONI, K. A., GAILER, J., EDMONDS, J. S., GOESSLER, W. & IRGOLIC, K. J. 1999. Uptake of arsenic-betaines by the mussel *Mytilus edulis*. *Comparative Biochemistry and Physiology C-Pharmacology Toxicology & Endocrinology*, 122, 131-137.
- HEDOUIN, L., BUSTAMANTE, P., CHURLAUD, C., PRINGAULT, O., FICHEZ, R. & WARNAU, M. 2009a. Trends in concentrations of selected metalloid and metals in two bivalves from the coral reefs in the SW lagoon of New Caledonia. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72, 372-381.
- HEDOUIN, L., REICHEL-T-BRUSHETT, A. J. & GATES, R. D. 2009b. Assessment of metals and a metalloid in sediments from Hawaiian coral reef ecosystems. *Marine Pollution Bulletin*, 58, 1759-1765.
- HUNG, D. Q., NEKRASSOVA, O. & COMPTON, R. G. 2004. Analytical methods for inorganic arsenic in water: a review. *Talanta*, 64, 269-277.
- JAIN, C. K. & ALI, I. 2000. Arsenic: occurrence, toxicity and speciation techniques. *Water Research*, 34, 4304-4312.
- JOIRIS, C. R. & AZOKWU, M. I. 1999. Heavy metals in the bivalve *Anadara (Senilia) senilis* from Nigeria. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 618-622.
- MARQUES, A. P. G. C., MOREIRA, H., RANGEL, A. O. S. S. & CASTRO, P. M. L. 2009. Arsenic, lead and nickel accumulation in *Rubus ulmifolius* growing in contaminated soil in Portugal. *Journal of Hazardous Materials*, 165, 174-179.
- MIGUEL, C. S., MACHADO, L. M. & BEBIANNO, M. J. 1999. Concentrações de Cd, Cu e Zn em Mexilhões *Mytilus galloprovincialis* e Lapas *Patella aspera*, ao Longo da Costa Algarvia (Sul de Portugal). *Ecotoxicology and Environmental Restoration*, 2 (1), 1-7.
- MILLER, J. N. & MILLER, J. C. 2005. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, Harlow, Pearson Education Limited.
- MILLWARD, G. E., KITTS, H. J., EBDON, L., ALLEN, J. I. & MORRIS, A. W. 1997. Arsenic in the Thames Plume, UK. *Marine Environmental Research*, 44, 51-67.
- MOK, W. M. & WAI, C. M. 1994. Mobilizaion of arsenic in contaminated river waters. In: NRIAGU, J. O. (ed.) *Arsenic in the Environment* New York: Wiley-Intercience
- MONTERROSO, P. 2004. *Distribuição e comportamento do cádmio, chumbo, cobre e zinco nos sedimentos e coluna de água da Ria de Aveiro*. Tese de Doutoramento, Universidade de Aveiro.

- MOORE, J. N., FICKLIN, W. H. & JOHNS, C. 1988. Partitioning of arsenic and metals in reducing sulfidic sediments. *Environmental Science & Technology*, 22, 432-437.
- MOREIRA, S. M., LIMA, I., RIBEIRO, R. & GUILHERMINO, L. 2006. Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and in situ assays. *Aquatic Toxicology*, 78, 186-201.
- NRIAGU, J. O. 1994. *Arsenic in the environment*, New York, Wiley-Interscience.
- O'NEILL, P. 1990. *Arsenic*, Glasgow, Blackie and Son.
- PALMA, P., ALVARENGA, P., PALMA, V., MATOS, C., FERNANDES, R. M., SOARES, A. & BARBOSA, I. R. 2010. Evaluation of surface water quality using an ecotoxicological approach: a case study of the Alqueva Reservoir (Portugal). *Environmental Science and Pollution Research*, 17, 703-716.
- PEREIRA, M. E., ABREU, S., COELHO, J. P., PATO, P., PARDAL, M. A. & DUARTE, A. C. 2008. Influence of tidal resuspension on seston lithogenic and biogenic partitioning in shallow estuarine systems: Implications for sampling. *Marine Pollution Bulletin*, 56, 348-354.
- PEREIRA, M. E., ABREU, S., PATO, P., COELHO, J. P., AZEITEIRO, U. M., PARDAL, M. A. & DUARTE, A. C. 2007. Seasonal mercury concentrations in plankton-net material from a contaminated coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal). *Fresenius Environmental Bulletin*, 16, 1442-1450.
- PEREIRA, M. E., LILLEBO, A. I., PATO, P., VALEGA, M., COELHO, J. P., LOPES, C. B., RODRIGUES, S., CACHADA, A., OTERO, M., PARDAL, M. A. & DUARTE, A. C. 2009. Mercury pollution in Ria de Aveiro (Portugal): a review of the system assessment. *Environmental Monitoring and Assessment*, 155, 39-49.
- RIDGWAY, J., BREWARD, N., LANGSTON, W. J., LISTER, R., REES, J. G. & ROWLATT, S. M. 2003. Distinguishing between natural and anthropogenic sources of metals entering the Irish Sea. *Applied Geochemistry*, 18, 283-309.
- RIDGWAY, J. & SHIMMIELD, G. 2002. Estuaries as repositories of historical contamination and their impact on shelf seas. *Estuarine Coastal and Shelf Science*, 55, 903-928.
- RIEDEL, G. F. 1993. The annual cycle of arsenic in a temperate estuary. *Estuaries*, 16, 533-540.
- RIEDEL, G. F., SANDERS, J. G. & OSMAN, R. W. 1987. The effect of biological and physical disturbances on the transport of arsenic from contaminated estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 25, 693-706.

- RINGMANN, S., BOCH, K., MARQUARDT, W., SCHUSTER, M., SCHLEMMER, G. & KAINRATH, P. 2002. Microwave-assisted digestion of organoarsenic compounds for the determination of total arsenic in aqueous, biological, and sediment samples using flow injection hydride generation electrothermal atomic absorption spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 452, 207-215.
- RODRIGUES, S. M., HENRIQUES, B., COIMBRA, J., DA SILVA, E. F., PEREIRA, M. E. & DUARTE, A. C. 2010. Water-soluble fraction of mercury, arsenic and other potentially toxic elements in highly contaminated sediments and soils. *Chemosphere*, 78, 1301-1312.
- ROSA, M. 2006. *Mercúrio e amêijoia: uma relação perigosa?* Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.
- RUIZ, J. M. & SAIZ-SALINAS, J. I. 2000. Extreme variation in the concentration of trace metals in sediments and bivalves from the Bilbao estuary (Spain) caused by the 1989-90 drought. *Marine Environmental Research*, 49, 307-317.
- SANDERS, J. G. 1980. Arsenic cycling in marine systems. *Marine Environmental Research*, 3, 257-266.
- SPENCER, K. L. 2002. Spatial variability of metals in the inter-tidal sediments of the Medway Estuary, Kent, UK. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 933-944.
- SUHENDRAYATNA, OHKI, A., NAKAJIMA, T. & MAEDA, S. 2002. Studies on the accumulation and transformation of arsenic in freshwater organisms II. Accumulation and transformation of arsenic compounds by *Tilapia mossambica*. *Chemosphere*, 46, 325-331.
- TAMAKI, S. & FRANKENBERGER, W. T. 1992. Environmental biochemistry of arsenic. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 124, 79-110.
- TAVARES, D. 2010. *Remoção de arsénio da água usando adsorventes produzidos a partir de bioresíduos*. Tese de mestrado, Universidade de Aveiro.
- UNLU, M. Y. & FOWLER, S. W. 1979. Factors affecting the flux of arsenic through the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Biology*, 51, 209-219.
- VALETTE-SILVER, N. J., RIEDEL, G. F., CRECELIUS, E. A., WINDOM, H., SMITH, R. G. & DOLVIN, S. S. 1999. Elevated arsenic concentrations in bivalves from the southeast coasts of the USA. *Marine Environmental Research*, 48, 311-333.
- VERDELHOS, T. 2003. *Impacto da eutrofização na dinâmica populacional e produção de scrobicularia plana (da costa) no Estuário do Mondego*. Tese de Mestrado, Universidade de Coimbra.
- VIARENGO, A. & CANESI, L. 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture*, 94, 225-243.

- VILANO, M. & RUBIO, R. 2001. Determination of arsenic species in oyster tissue by microwave-assisted extraction and liquid chromatography-atomic fluorescence detection. *Applied Organometallic Chemistry*, 15, 658-666.
- WALSH, P. R., DUCE, R. A. & FASCHING, J. L. 1979. Considerations of the enrichment, sources and flux of arsenic in the troposphere. *Journal of Geophysical Research-Oceans and Atmospheres*, 84, 1719-1726.
- WATRAS, C. J., BACK, R. C., HALVORSEN, S., HUDSON, R. J. M., MORRISON, K. A. & WENTE, S. P. 1998. Bioaccumulation of mercury in pelagic freshwater food webs. *Science of the Total Environment*, 219, 183-208.
- WHO, W. H. O. 2001. Arsenic and Arsenic compounds. 2nd ed.
- WOOLSON, E. 1983. *Biological and environmental effects of arsenic*, Amsterdam, Elsevier.
- YAN-CHU, H. 1994. Arsenic distribution in soils. In: NRIAGU, J. O. (ed.) *Arsenic in the Environment* New York: Wiley-Interscience.
- ZHU, B. J. & TABATABAI, M. A. 1995. An alkaline oxidation method for determination of total arsenic and selenium in sewage sludges. *Journal of Environmental Quality*, 24, 622-626.